

Universidade de São Paulo

Escola Politécnica

Departamento de Engenharia Química

Laura Naomi Isozaki Sato

Efeito do processamento térmico convencional e por micro-ondas na
inativação de inibidores de tripsina do extrato hidrossolúvel de soja

São Paulo

2020

Universidade de São Paulo
Escola Politécnica
Departamento de Engenharia Química

Laura Naomi Isozaki Sato

Efeito do processamento térmico convencional e por micro-ondas na
inativação de inibidores de tripsina do extrato hidrossolúvel de soja

Versão Original

Relatório apresentado à Escola Politécnica da
Universidade de São Paulo, como parte da disciplina
PQI3502 – Trabalho de Conclusão de Curso II

Orientador: Prof. Dr. Jorge A. W. Gut
Coorientadora: Dra. Mirian T. K. Kubo

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Catálogo-na-publicação

Sato, Laura Naomi Isozaki

EFEITO DO PROCESSAMENTO TÉRMICO CONVENCIONAL E POR MICRO-ONDAS NA INATIVAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA / L. N. I. Sato – São Paulo, 2020

Trabalho de Conclusão de Curso – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química

1. Micro-ondas 2. Inibidores de tripsina 3. Extrato hidrossolúvel de soja (EHS)

Efeito do processamento térmico convencional e por micro-ondas na inativação de inibidores de tripsina do extrato hidrossolúvel de soja

Laura Naomi Isozaki Sato

RESUMO

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS), popularmente conhecido como leite de soja, possui muitas qualidades nutricionais e está associado a diversos benefícios à saúde. No entanto, uma de suas limitações em relação ao seu consumo e aceitação está na presença de fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina. A fim de inativar esta substância, o método mais comumente utilizado é o de tratamento térmico por trocadores de calor, processo que pode resultar na degradação de cor, sabor, textura e qualidade nutricional do produto devido à exposição ao calor excessivo. Em contraste ao aquecimento convencional, o baixo tempo de processamento e o aquecimento de forma mais eficiente e uniforme são as principais vantagens do aquecimento por micro-ondas focalizadas, podendo fornecer melhor qualidade sensorial e nutricional em relação ao processo de aquecimento convencional. Dessa forma, neste trabalho foi feito um estudo comparativo do EHS submetido ao processamento térmico convencional em banho termostático e por micro-ondas, focando na inativação dos inibidores de tripsina, em diferentes condições de tempo e temperatura. A determinação da atividade de inibidores de tripsina foi baseada na hidrólise do substrato BAPNA (hidroclorato de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida). Após sucessivos estudos de métodos apresentados na literatura, adaptou-se um método por espectrofotometria por microplaca. Observou-se que a inativação dos inibidores de tripsina é maior conforme aumenta-se a temperatura e/ou tempo de retenção, tanto para o tratamento por micro-ondas quanto o convencional, sendo coerente com o esperado. Ademais, obteve-se um bom ajuste da cinética de inativação dos inibidores de tripsina utilizando-se o modelo de primeira ordem com duas frações. Logo, tal projeto visa colaborar com o estudo da aplicação e viabilidade do processamento por micro-ondas do EHS e, por conseguinte, com o desenvolvimento e otimização de sistemas industriais de aplicação dessa tecnologia.

Palavras-chave: Micro-ondas. Inibidores de tripsina. Extrato hidrossolúvel de soja (EHS).

Effects of conventional and microwave thermal processing on the inactivation of trypsin inhibitors of soymilk

Laura Naomi Isozaki Sato

ABSTRACT

The soymilk has many nutritional qualities and is associated with several health benefits. However, one of its limitations is the presence of antinutritional factors, such as trypsin inhibitors. In order to inactivate it, the most commonly used method is heat treatment by heat exchangers, a process that can result in the degradation of color, flavor, texture and nutritional quality of the product due to exposure to excessive heat. In contrast to conventional heating, the low processing time and the more efficiently and uniformly heating are the main advantages of focused microwave thermal processing, which can provide better sensory and nutritional quality compared to the conventional one. Therefore, in this work, a comparative study of soymilk submitted to conventional and microwave thermal processing, focusing on the inactivation of trypsin inhibitors, under different conditions of time and temperature, was performed. The activity of trypsin inhibitors was measured based on the hydrolysis of the BAPNA (benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride). After successive studies of methods presented in the literature, a method using microplate spectrophotometry was adapted. It was observed that the inactivation of trypsin inhibitors is greater as the temperature and/or retention time increases, both for microwave and conventional treatment, being consistent with what was expected. Furthermore, the first-order inactivation model with two fractions provided a good fit for the kinetics of trypsin inhibitor inactivation. Thus, this project aims to collaborate with the study of the application and viability of microwave processing of soymilk and, therefore, with the development and optimization of industrial systems for the application of this technology.

Keywords: Microwave. Trypsin inhibitors. Soymilk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grãos de soja hidratados para preparo do extrato hidrossolúvel de soja.	18
Figura 2 - Resíduos sólidos filtrados do extrato hidrossolúvel de soja.	18
Figura 3 - Reator micro-ondas.	19
Figura 4 - Sensor de fibra óptica.	20
Figura 5 - Banho termostático.	21
Figura 6 – Exemplo de microplaca com as amostras estudadas.	21
Figura 7 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 1 minuto.	26
Figura 8 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 5 minutos.	26
Figura 9 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 9 minutos.	27
Figura 10 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 15 minutos.	27
Figura 11 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 30 minutos.	28
Figura 12 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 1 minuto.	28
Figura 13 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 5 minutos.	29
Figura 14 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 9 minutos.	29
Figura 15 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 15 minutos.	30
Figura 16 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 30 minutos.	30
Figura 17 - Comparação de resultados, a partir do Método 2, de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento por micro-ondas em diferentes condições de tempo e temperatura.	33
Figura 18 - Tubos utilizados no Método 2.	34

Figura 19 - Comparação de resultados, a partir do Método 3, de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento por micro-ondas em diferentes condições de tempo e temperatura	35
Figura 20 - Comparação de resultados, a partir do Método 3, de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento convencional em diferentes condições de tempo e temperatura	35
Figura 21 - Comparação de resultados, a partir do Método 3, da média de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento por micro-ondas e convencional em diferentes condições de tempo e temperatura	36
Figura 22 - Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem) e com a experimental por tratamento micro-ondas	38
Figura 23 - Gráfico da atividade residual predita (modelo de primeira ordem) e experimental dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção equivalente a um tratamento térmico micro-ondas a 90 °C.....	38
Figura 24 - Gráfico da atividade residual dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção no tratamento térmico micro-ondas a 80 e 90 °C, predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações	39
Figura 25 – Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem com duas frações) e com a experimental por tratamento micro-ondas.....	40
Figura 26 - Resultados de validação do modelo cinético de primeira ordem com duas frações para o tratamento por micro-ondas	41
Figura 27 - Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem) e com a experimental por tratamento convencional.....	42
Figura 28 - Gráfico da atividade residual predita (modelo de primeira ordem) e experimental dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção equivalente a um tratamento térmico convencional a 90 °C	42
Figura 29 - Gráfico da atividade residual dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção no tratamento térmico convencional a 80 e 90 °C, predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações.....	43

Figura 30 - Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem com duas frações) e com a experimental por tratamento convencional.	44
Figura 31 - Resultados de validação do modelo cinético de primeira ordem com duas frações para o tratamento convencional.	45
Figura 32 - Gráfico da atividade residual dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção no tratamento térmico convencional e por micro-ondas a 90 °C, predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento micro-ondas.....	37
Tabela 2 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem com duas frações da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento micro-ondas.....	39
Tabela 3 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento convencional.	41
Tabela 4 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem com duas frações da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento micro-ondas.....	43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 MOTIVAÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	14
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.3.1 Soja	14
1.3.2 Extrato de Soja.....	15
1.3.3 Aquecimento por micro-ondas	16
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 PREPARO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS)....	17
2.2 TRATAMENTO POR MICRO-ONDAS	18
2.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL	20
2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA	21
3. TRATAMENTO DE DADOS	23
3.1 TRATAMENTO POR MICRO-ONDAS E TRATAMENTO CONVENCIONAL.....	23
3.2 DETERMINAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA	23
3.3 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA .	23
4. RESULTADOS	25
4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA	25
4.2 TRATAMENTO POR MICRO-ONDAS E CONVENCIONAL.....	25
4.3 DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA.....	31
4.3.1 Método 1	31
4.3.2 Método 2.....	32
4.3.3 Método 3.....	34

4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA	34
4.5	CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA	37
4.5.1	Tratamento por micro-ondas.....	37
4.5.2	Tratamento convencional.....	41
4.5.3	Comparação entre os tratamentos térmicos	45
5.	CONCLUSÕES	46

1. INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

Na última década, a ênfase principal de pesquisa na área de desenvolvimento de produtos alimentícios é atender às necessidades e demandas atuais do consumidor, criando novas alternativas de alimentos saudáveis. Um desses requisitos funcionais importantes são as alternativas ao leite a fim de atender àqueles alérgicos à proteína do leite de vaca, intolerantes à lactose, hipercolesterolêmicos, vegetarianos, veganos ou aqueles que buscam dietas menos calóricas (SETHI et al., 2016).

Em relação à frequência da intolerância à lactose nos adultos, os norte-europeus brancos, norte-americanos e australianos têm as taxas mais baixas, variando de 5% na população britânica a 17% na Finlândia e no norte da França. Já na América do Sul, África e Ásia, mais de 50% da população possuem hipolactasia e em alguns países asiáticos essa taxa é quase de 100%. Como resultado, o consumo de leite à base de plantas tem aumentado devido à ausência de colesterol e lactose, tornando-o adequado para um grupo de população que sofre de intolerância à lactose e doenças cardíacas (SETHI et al., 2016).

O extrato hidrossolúvel de soja (EHS), popularmente conhecido como leite de soja, possui muitas qualidades nutricionais e está associado a diversos benefícios à saúde. A soja possui teor proteico de alta qualidade, além de ser fonte de vitaminas (cerca de 7 e 0,3 mg/10ml de riboflavina e tiamina, respectivamente (LAKSHMANAN et al., 2006)), compostos bioativos, minerais e conter baixo teor de gordura. Ademais, pesquisadores tem associado o consumo de produtos derivados de soja com a redução de doenças cardíacas coronárias, aterosclerose, diabetes tipo 2, câncer colorretal, de mama e de próstata (ANDERSON et al., 1995; KERWIN, 2004; LAKSHMANAN et al., 2006; HWANG et al., 2009).

Em 1999, a FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos aprovou uma alegação funcional para produtos de soja, devido aos efeitos hipocolesterolêmicos associados à sua proteína. Ficou estabelecido que a ingestão de uma dieta pobre em gordura saturada e em colesterol e que incluísse 25 g de proteína de soja diariamente poderia reduzir o risco de doenças cardiovasculares (FDA, 1999).

No entanto, uma de suas limitações em relação ao seu consumo e aceitação está na presença de fatores antinutricionais, como os inibidores de tripsina. Trata-se de um

grupo de enzimas serino-proteases que reduzem a atividade biológica da enzima digestiva tripsina, a qual é produzida em sua forma inativa (tripsinogênio) no pâncreas e é ativada durante a digestão à medida que entra no intestino delgado. A ingestão de inibidores de tripsina pode resultar na formação de um complexo irreversível de tripsina-inibidor de tripsina, que leva a uma queda da protease no intestino, interferindo no processo de digestibilidade das proteínas (VAGADIA et al., 2017). Diante dessa situação, o organismo aumenta a atividade secretora do pâncreas, o que pode causar hipertrofia e hiperplasia pancreáticas (EMBABY, 2010).

A fim de inativar esta substância, o método mais comumente utilizado é o de tratamento térmico por trocadores de calor. Contudo, tal processo pode resultar no sobreaquecimento superficial do produto e, por conseguinte, na degradação da qualidade sensorial (como escurecimento e alterações de sabor e textura) e qualidade nutricional (como diminuição da solubilidade de proteínas e degradação de vitaminas) do produto devido à exposição ao calor excessivo. (KWOK; NIRANJAN, 1995; VAGADIA et al., 2018)

Em contraste ao aquecimento convencional, o baixo tempo de processamento e o aquecimento de forma mais eficiente e uniforme são as principais vantagens do aquecimento por micro-ondas focalizadas, pois o calor é gerado dentro do alimento pela conversão de energia de campo elétrico alternado para energia térmica. Provou-se que o aquecimento por micro-ondas é efetivo na inativação de uma ampla gama de microrganismos e enzimas e, além disso, pode fornecer melhor qualidade sensorial e nutricional em relação ao processo de aquecimento convencional (ZHU et al., 2012; SALAZAR-GONZALEZ et al., 2012).

Quando as micro-ondas penetram em uma solução aquosa, ocorre uma interação dipolar: as moléculas de água tendem a acompanhar a oscilação do campo elétrico, gerando uma fricção intermolecular que é convertida em calor. Ademais, a condução iônica é outro importante mecanismo do aquecimento por micro-ondas, no qual os íons presentes na solução são obrigados a fluir inicialmente em um sentido e então, devido à influência de um campo elétrico alternado, deslocam-se para o sentido oposto, colidindo entre si e também contra outras moléculas, gerando energia cinética que é convertida em energia térmica. Soluções com uma maior concentração de íons tendem a ter maior quantidade de colisões e, portanto, apresentam um maior aumento de temperatura em relação a soluções menos concentradas (SALAZAR-GONZALEZ et al., 2012).

Dessa forma, neste trabalho foi feito um estudo comparativo do EHS submetido ao processamento térmico convencional em banho termostático e por micro-ondas, focando na inativação dos inibidores de tripsina, em diferentes condições de tempo e temperatura. Logo, tal projeto visa colaborar com o estudo da aplicação e viabilidade do processamento por micro-ondas do EHS e, por conseguinte, com o desenvolvimento e otimização de sistemas industriais de aplicação dessa tecnologia.

1.2 OBJETIVOS

Estudar a inativação de inibidores de tripsina do extrato hidrossolúvel de soja submetido ao tratamento térmico convencional e por micro-ondas, em diferentes combinações de tempo de retenção e temperatura de processamento e estimar os parâmetros cinéticos de inativação.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Soja

Soja é o principal produto oleaginoso produzido e consumido atualmente no mundo, compreendendo 60% da produção mundial de oleaginosas em 2018/2019. Os maiores produtores mundiais são EUA, Brasil e Argentina com, respectivamente, 33,6%, 32,6% e 15,4% dos totais de 358,65 milhões de toneladas produzidas em 2018/2019 (USDA, 2020).

Contendo cerca de 40% de proteína e quase 20% de óleo em base seca, a soja fornece a fonte mais barata de proteína e óleo comestível de alta qualidade (KWOK; NIRANJAN, 1995), além de ser fonte de vitaminas (riboflavina e tiamina) e compostos bioativos (isoflavonas e fitoestrógenos) (LAKSHMANAN et al., 2006). Ademais, o óleo de soja possui excelente perfil de ácidos graxos, sendo constituído por aproximadamente 85% de ácidos graxos poliinsaturados, destacando-se o ácido linoleico e o ácido α -linolênico, sendo este da família ômega 3, de grande importância à saúde humana (MESSINA, 2007). A soja possui ainda 35% de carboidratos, sendo representados pelo amido e fibras insolúveis (celulose e hemicelulose) e solúveis (pectinas e oligossacarídeos como a estaquiose, rafinose e verbascose). As fibras insolúveis da soja não são digeridas no trato gastrointestinal humano e atuam normalizando a mobilidade intestinal, reduzindo

o risco de constipação e diverticulite. Já as fibras solúveis contribuem para controle da insulinemia de pacientes com diabetes tipo II e para a redução dos níveis LDL-colesterol no sangue (LIENER, 1994). Logo, o custo relativamente baixo da proteína de soja em comparação com as proteínas animais e, a maneira simples como pode ser transformada em alimento rico em proteínas, tornam seu uso como fonte de proteína particularmente relevante para os países em desenvolvimento (ANG et al., 1985).

A soja tem sido usada em vários produtos alimentares na China e no Japão há muitos séculos. Para muitos outros países, no entanto, trata-se é uma fonte de proteína não convencional, sendo bastante limitada a sua utilização como fonte de proteínas para consumo humano. Nos Estados Unidos e na Europa, o óleo de soja é usado para alimentação humana sobretudo na forma de margarina e gordura, sendo que ainda uma porção muito pequena da proteína de soja encontra seu caminho em produtos de consumo humano (KWOK; NIRANJAN, 1995).

1.3.2 Extrato de Soja

O extrato hidrossolúvel de soja, popularmente conhecido como leite de soja, é um extrato aquoso, branco e cremoso produzido a partir da soja, sendo semelhante ao leite de vaca na aparência e consistência. Trata-se de um alimento altamente nutritivo que contém proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e minerais (KOHLI et al., 2017).

A crescente popularidade do leite de soja como bebida em todo o mundo é creditada aos benefícios à saúde, tais como a presença de proteína de alta qualidade, baixo teor de colesterol e lactose, capacidade de reduzir a perda óssea e sintomas da menopausa, prevenção e redução de doenças cardíacas e certos tipos de câncer. Dessa forma, o consumo de leite de soja está aumentando nos países ocidentais, principalmente entre os consumidores que são intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite, veganos e/ou procuram dietas menos calóricas (ANDERSON et al., 1995; KERWIN, 2004; KOHLI et al., 2017; LAKSHMANAN et al., 2006; HWANG et al., 2009).

No entanto, o extrato de soja contém compostos biologicamente ativos indesejados como os inibidores de tripsina e a enzima lipoxigenase. Os inibidores de tripsina são proteína não glicosiladas que reduzem a atividade biológica da enzima digestiva tripsina, produzida em sua forma inativa (tripsinogênio) no pâncreas e ativada durante a digestão à medida que entra no intestino delgado. Desse modo, a ingestão de

inibidores de tripsina pode resultar na formação de um complexo irreversível de tripsina-inibidor de tripsina, que leva a uma queda da protease no intestino, interferindo no processo de digestibilidade das proteínas (VAGADIA et al., 2017). Como resposta, o organismo aumenta a atividade secretora do pâncreas, o que pode levar à hipertrofia e hiperplasia pancreáticas (um aumento nas células acinares do pâncreas) (EMBABY, 2010). A lipoxigenase é responsável pelo odor e sabor indesejável formado por oxidação de ácido graxo poliinsaturado (ácido linolênico e linoleico) e formação de hidroperóxidos, reação instantânea que ocorre quando o tecido bruto dos cotilédones de soja é danificado ou quebrado em meio aquoso, durante a moagem dos grãos (KWOK; NIRANJAN, 1995; VAGADIA et al., 2017). Dessa forma, a inativação dessa substância faz-se necessária a fim de promover melhor aceitação sensorial do extrato de soja.

1.3.3 Aquecimento por micro-ondas

O aquecimento por micro-ondas focalizadas, também conhecido como aquecimento dielétrico, tem como principais vantagens o baixo tempo de processamento e o aquecimento de forma mais eficiente e uniforme em relação ao aquecimento convencional. Nesse processo, o calor é gerado dentro do alimento pela conversão de energia de campo elétrico alternado para energia térmica. Provou-se que o aquecimento por micro-ondas é efetivo no combate de uma ampla gama de microrganismos e, além disso, fornece melhor cor, sabor, textura e nutrientes comparativamente ao processo de aquecimento convencional (ZHU et al., 2012; SALAZAR-GONZALEZ et al., 2012)

As propriedades dielétricas são permissividade elétrica relativa e fator de perda dielétrica. A permissividade elétrica está relacionada à capacidade de um material não condutivo de armazenar energia em resposta a um campo elétrico aplicado. Já o fator de perda dielétrica relaciona-se à capacidade do material não condutivo de dissipar energia na forma de calor em resposta a um campo elétrico aplicado (WANG et al., 2003). Dessa forma, as propriedades dielétricas são as mais importantes associadas ao processo de aquecimento por micro-ondas, sendo influenciada, sobretudo, pela frequência do campo elétrico e das características do material, como volume, geometria, estado de agregação e composição (TANG et al., 2005; SALAZAR-GONZALEZ et al., 2012).

Quando as micro-ondas penetram em uma solução aquosa, ocorre uma interação dipolar: as moléculas de água tendem a acompanhar a oscilação do campo elétrico,

gerando uma fricção intermolecular que é convertida em calor. À medida que o calor é gerado, ele flui através dos componentes do alimento, se propagando em todas as direções. Ademais, outro importante mecanismo do aquecimento por micro-ondas é a condução iônica, no qual os íons presentes na solução são obrigados a fluir inicialmente em um sentido e então, devido à influência de um campo elétrico alternado, deslocam-se para o sentido oposto, colidindo entre si e também contra outras moléculas, gerando energia cinética que é convertida em energia térmica. Soluções com uma maior concentração de íons tendem a ter maior quantidade de colisões e, portanto, apresentam um maior aumento de temperatura em relação a soluções menos concentradas (SALAZAR-GONZALEZ et al., 2012).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PREPARO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA (EHS)

Grãos de soja, adquiridos em mercado local da cidade de São Paulo, foram higienizados, pesados (100 g) por meio uma balança eletrônica modelo S3-102 (BEL Equipamentos Ltda., Brasil) e então colocados em água destilada para serem hidratados durante 12 horas a 5°C. A seguir, foram drenados com uma peneira e lavados com água corrente. Os grãos foram novamente pesados (Figura 1) e, a partir da diferença entre o peso inicial e o peso após a hidratação, foi determinada a absorção de água. Ademais, adicionou-se água destilada até ser obtida uma proporção mássica final de 1:8 soja:água (LAKSHMANAN; DE LAMBALLERIE; JUNG, 2006). Este conteúdo foi triturado com o auxílio de um mixer modelo 2619-017 (Oster, Brasil) a temperatura ambiente, e a seguir filtrou-se para a retirada dos sólidos (Figura 2). O EHS obtido foi dividido em 3 porções: EHS sem tratamento (controle), EHS para tratamento por micro-ondas e EHS para tratamento convencional. A cada lote de EHS, foi medido o pH com o pHmetro modelo Tec-3MP (Tecnal, Brasil) e o teor de sólidos solúveis (°Brix) em refratômetro digital (Schmidt Haensch, Alemanha).



Figura 1 - Grãos de soja hidratados para preparo do extrato hidrossolúvel de soja.

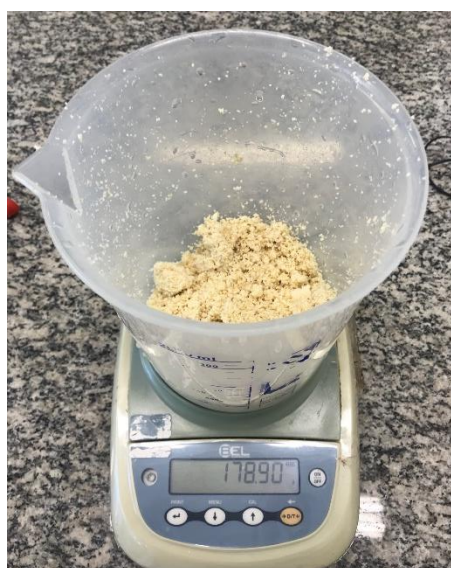


Figura 2 - Resíduos sólidos filtrados do extrato hidrossolúvel de soja.

2.2 TRATAMENTO POR MICRO-ONDAS

O tratamento por micro-ondas focalizadas foi realizado em um reator micro-ondas modelo Discover Reflux (CEM Corporation, EUA) (Figura 3), conforme descrito por Siguemoto et al. (2018). Com o auxílio de uma pipeta automática modelo Transferpette (BrandTech Scientific, EUA), 8 ml da amostra foi colocada em um tubo de ensaio de vidro dentro da cavidade cilíndrica do reator. O reator opera a 2450 MHz, possui potência

máxima de 300 W. A amostra foi aquecida sob agitação magnética para garantir a uniformidade da distribuição de temperatura.



Figura 3 - Reator micro-ondas.

O tratamento do extrato de soja foi realizado a diferentes combinações de temperaturas (80 e 90 °C) e tempos de retenção (1, 5, 9, 15 e 30 minutos), em duplicatas. Até atingir a temperatura desejada, o reator foi configurado para operar com potência de 300 W, visto que com esta o perfil de variação de temperatura da amostra é mais semelhante com o observado no aquecimento no banho termostático. Atingida a temperatura de tratamento, iniciou-se a contagem do tempo de retenção e, simultaneamente, controlou-se a potência do reator de modo a manter a temperatura o mais constante possível. Terminado o tempo de retenção, a amostra foi resfriada em banho de água com gelo sob agitação manual até no mínimo 6°C, e então armazenada em tubo tipo Falcon e congelada à -30 °C para posterior análise. O histórico de evolução da temperatura ao longo de todo o tratamento foi medido e registrado a cada 0,5 s por um sensor de fibra óptica modelo Luxtron 812 (LumaSense Technologies, EUA) (Figura 4). Tal sensor de temperatura possui um tempo de resposta rápido e é o mais apropriado para aplicações em micro-ondas, nos quais o uso de termopares não é recomendado pois seus constituintes metálicos podem causar interferências no campo eletromagnético.



Figura 4 - Sensor de fibra óptica.

Além das combinações de temperatura e tempo de tratamento já estabelecidas, foram realizadas também ensaios com temperaturas diferentes para serem utilizadas durante a etapa de validação do modelo cinético de inativação estimado. As condições escolhidas foram:

- 75 °C por 3 minutos;
- 85 °C por 3 minutos;
- 85 °C por 15 minutos;
- 95 °C por 1 minuto;
- 95 °C por 9 minutos.

2.3 TRATAMENTO CONVENCIONAL

O tratamento térmico convencional do extrato de soja foi realizado em banho termostático modelo MA-184 (Marconi, Brasil) (Figura 5), conforme descrito por Aguiar et al. (2012) e Siguemoto et al. (2018). A amostra foi acondicionada em bolsa de polietileno (40 mm de largura, 230 mm de altura e 0,06 mm de espessura) e imersa em água quente sob agitação. Os mesmos pares de tempo-temperatura utilizados no tratamento por micro-ondas foram testados. A história térmica da amostra foi também controlada e registrada pelo sensor de fibra óptica. Foram também feitos tratamentos térmicos convencional nas condições de validação descritas na seção anterior.



Figura 5 - Banho termostático.

2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

A análise da atividade dos inibidores de tripsina é baseada na hidrólise do substrato BAPNA (hidroclorato de benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida) gerando p-nitroanilina, o qual apresenta coloração amarelada (Figura 6) cuja formação pode ser acompanhada em espectrofotômetro na faixa de comprimento de 410 nm. Quanto maior a hidrólise de substrato, maior será a intensidade da cor amarela formada (KAKADE et al., 1974; VAN DER VEN et al, 2005; BELTRÁN et al., 2009).

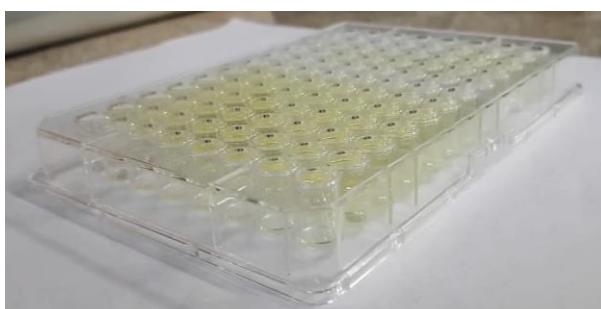


Figura 6 – Exemplo de microplaca com as amostras estudadas.

Dessa forma, foram testados e adaptados métodos disponíveis na literatura que se fundamentam nesse mecanismo. Na seção de Resultados, alguns métodos testados e seus respectivos resultados são discutidos. A metodologia final escolhida é descrita a seguir.

Partindo dos métodos de Liu (2019) e de Chantapakul (2020), adaptou-se um método para determinação de inibidores de tripsina em microplaca. Foi preparada uma solução de enzima 0,02% (m/v) diluindo 2 mg de tripsina (Sigma-Aldrich, EUA) em 10 ml de solução de ácido clorídrico 1 mM. O substrato da tripsina 0,04% (m/v) foi preparado diluindo 10 mg de BAPNA (Sigma-Aldrich, Suíça) com 250 µl de dimetilsulfóxido, seguido de adição de solução tampão Tris-cloreto de cálcio (0,02 M tris-hidroximetilaminometano, pH 8,2) pré-aquecido à 37 °C até completar volume de 25 ml. Para a extração dos inibidores de tripsina do EHS, foram pesados 1,0 g de cada amostra, as quais foram diluídas em 50 ml de solução de hidróxido de sódio 0,01 M e mantidas sob agitação por 3 h a temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes correspondem aos extratos de inibidores de tripsina (extrato IT). Para a leitura das amostras, foram pipetados 150 µL de extrato IT diluído em água destilada, seguido de 100 µL de solução de BAPNA e 50 µL de solução de tripsina. A microplaca foi então colocada no espectrofotômetro de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, EUA) para leitura no comprimento de onda de 410 nm, a 37 °C, durante 10 minutos. Os valores de absorbância lidos aos 10 minutos foram registrados para posterior tratamento de dados.

Para cada amostra de extrato IT de EHS tratado, foram feitas quintuplicatas de leitura de amostra (S), duplicatas de branco de amostra (SB) e triplicatas de leitura de referência (R), além de duplicatas de branco de referência (RB) por microplaca. A solução R foi preparada substituindo o extrato IT pelo mesmo volume de água destilada; as soluções SB e RB foram preparadas com 150 µL de, respectivamente, extrato IT diluído e água destilada, seguido de adição de 100 µL de solução de BAPNA, 20 µL de ácido acético 30% (v/v) e 30 µL de solução de tripsina. Para as soluções de S e SB, a proporção de água : extrato IT adicionados foram variados de modo a obter uma % de inibição entre 30 e 70%, devido ao desvio de linearidade da atividade da tripsina em relação ao níveis de inibidores fora dessa faixa de inibição (LIU, MARKAKIS, 1989; LIU, 2019).

$$\% \text{ inibição de tripsina} = \frac{A_{410CR} - A_{410CS}}{A_{410CR}}$$

Em que:

$$A_{410R} - A_{410RB} = A_{410CR} = \textit{leitura de referência corrigida}$$

$$A_{410S} - A_{410SB} = A_{410CS} = \textit{leitura de amostra corrigida}$$

3. TRATAMENTO DE DADOS

3.1 TRATAMENTO POR MICRO-ONDAS E TRATAMENTO CONVENCIONAL

Os resultados registrados durante os ensaios no reator de micro-ondas foram importados para o Excel (Microsoft, EUA) e foram construídos gráficos de temperatura do tratamento em relação ao tempo.

3.2 DETERMINAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

Os resultados de absorvância das soluções nas microplacas após 10 minutos de reação foram registrados e tratados no Excel.

Para este trabalho, definiu-se como unidades de inibidor de tripsina (TIU) por ml de extrato IT como sendo:

$$TIU \text{ por ml de extrato IT} = \frac{A_{410CR} - A_{410CS}}{ml \text{ de extrato IT}}$$

Dessa forma, definiu-se também a atividade residual de inibidores de tripsina, em %, como sendo a razão de TIU da amostra tratada (por micro-ondas ou convencional) sobre TIU da respectiva amostra de controle (não tratada).

3.3 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

Para o estudo da cinética de inativação dos inibidores de tripsina, foram avaliados dois modelos: cinética de primeira ordem (Equação 1) e cinética de primeira ordem com duas frações (Equação 2). Nas equações, $\frac{A_t}{A_0}$ é a atividade enzimática residual no tempo t , k é a taxa de reação, os subscritos S e R indicam respectivamente as frações sensíveis e resistentes e α é a fração inicial da atividade enzimática da porção resistente.

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-k.t} \quad (1)$$

$$\frac{A_t}{A_0} = \alpha \cdot e^{-k_R.t} + (1 - \alpha) \cdot e^{-k_S.t} \quad (2)$$

Foi considerada a efetiva histórica térmica do EHS, incluindo as rampas de aquecimento e resfriamento (tratamento não-isotérmico), visto que esses períodos são comumente presentes nos processos térmicos de alimentos e possuem contribuição relevante para a inativação enzimática. Dessa forma, empregou-se o conceito de letalidade acumulada. Ademais, assumiu-se que a temperatura da amostra é homogênea a cada instante devido à agitação e aos pequenos volumes empregados (KUBO et al., 2018).

A letalidade acumulada foi obtida pela integração dos efeitos do perfil de temperatura na inativação durante os períodos de aquecimento, retenção e resfriamento. A letalidade acumulada foi expressa como o tempo de retenção equivalente ($F_{T_{Ref}}$), que é o tempo de retenção, a uma determinada temperatura de referência (T_{ref}), no caso ideal de aquecimento e resfriamento instantâneos, que produz a mesma inativação do processo não-isotérmico real (GUT; TADINI, 2016; KUBO et al., 2018; PELEG; NORMAND, 2004).

Para a cinética de primeira ordem, o $F_{T_{Ref}}$ e a atividade residual serão calculados conforme descrito nas Equações 3 e 4, respectivamente, em que D é o tempo de redução decimal e z o aumento de temperatura necessária para diminuir o valor de D em dez vezes (GUT; TADINI, 2016). A cinética de primeira ordem considera apenas uma porção enzimática a ser inativada. Trata-se de um modelo simplificado do mecanismo de inativação enzimática, cuja forma nativa da enzima passa para um único estado inativo devido à desnaturação.

$$F_{T_{Ref}} = \int_0^t 10^{\left(\frac{T_f - T_{ref}}{z}\right)} dt \quad (3)$$

$$\log\left(\frac{A_t}{A_0}\right) = -\frac{T_{ref}}{D_{T_{ref}}} \quad (4)$$

A cinética de duas frações considera a presença de duas frações autônomas – uma sensível (S) e uma resistente (R). A inativação dessas porções ocorre de forma independente e segue cinéticas de primeira ordem (Equação 5) (AGUIAR et al., 2012; FUJIKAWA; ITOH, 1996).

$$\frac{A_t}{A_0} = \alpha \cdot 10^{\left(-\frac{F_{T_{ref},R}}{D_{T_{ref},R}}\right)} + (1 - \alpha) \cdot 10^{\left(-\frac{F_{T_{ref},S}}{D_{T_{ref},S}}\right)} \quad (5)$$

Os parâmetros dos modelos cinéticos foram ajustados iterativamente por meio de estimação não linear, minimizando a soma de erros quadrados (SEQ) entre atividades enzimáticas residuais experimentais e preditas. Implementou-se um algoritmo generalizado de gradiente reduzido na ferramenta 'Solver' do software Excel 2016 (Microsoft, EUA). Para relatar os critérios de ajuste do modelo, o SEQ e o coeficiente de determinação R² foram considerados. Dados suplementares de atividades residuais foram utilizados para validação dos modelos.

4. RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL DE SOJA

No decorrer das disciplinas PQI-3411 TCC1 e PQI-3502 TCC II foram preparados lotes de EHS, cujos valores de pH e teor de sólidos solúveis são $6,44 \pm 0,12$ e $5,17 \pm 0,14$ °Brix, respectivamente. Considerando as massas de EHS e de resíduo, o rendimento do processo de obtenção do EHS foi de $82,1\% \pm 1,8\%$.

4.2 TRATAMENTO POR MICRO-ONDAS E CONVENCIONAL

Foram realizados ensaios no reator de micro-ondas e no banho termostático, sendo eles em temperaturas de 80 e 90 °C, com duração de 1, 5, 9, 15 e 30 minutos, em duplicatas. Nas Figura 7 a Figura 16 têm-se os gráficos do histórico de temperatura dos tratamentos realizados.

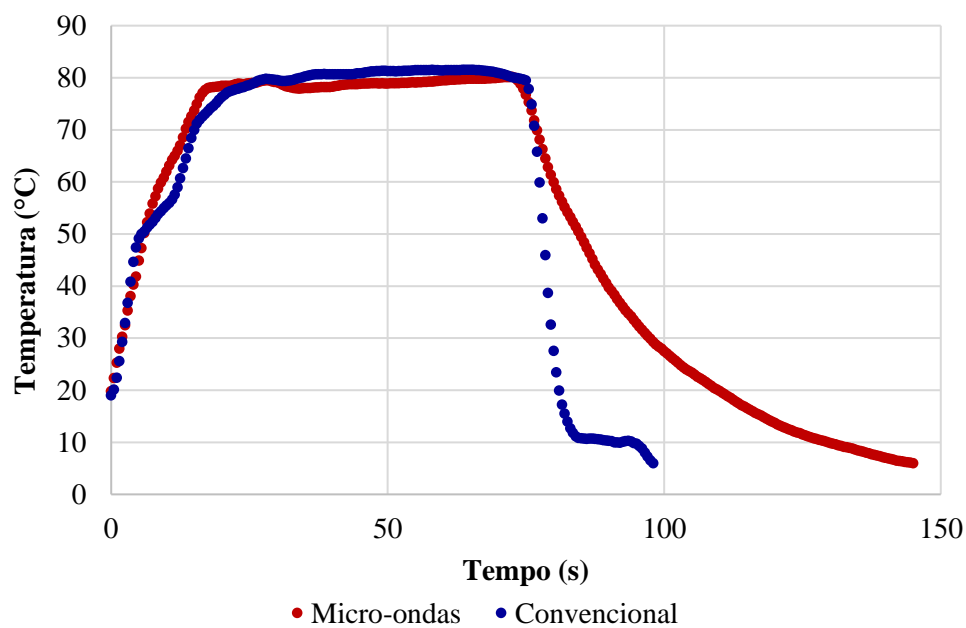


Figura 7 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 1 minuto.

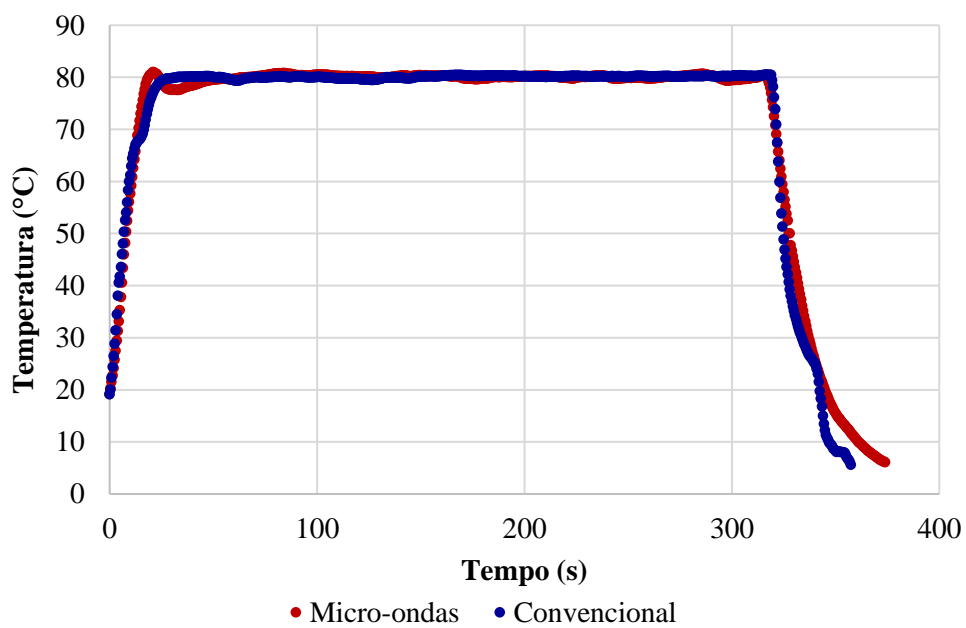


Figura 8 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 5 minutos.

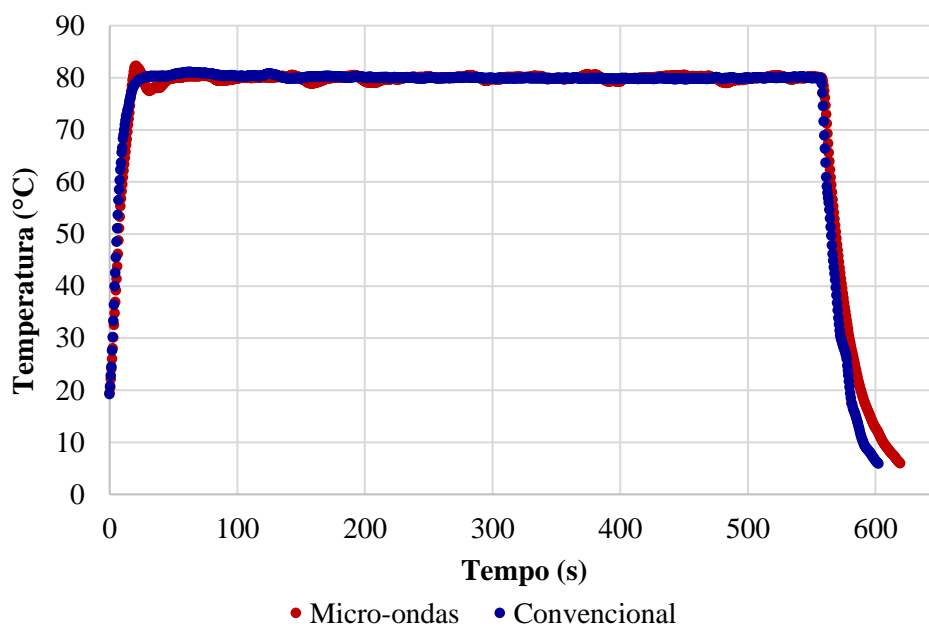


Figura 9 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 9 minutos.

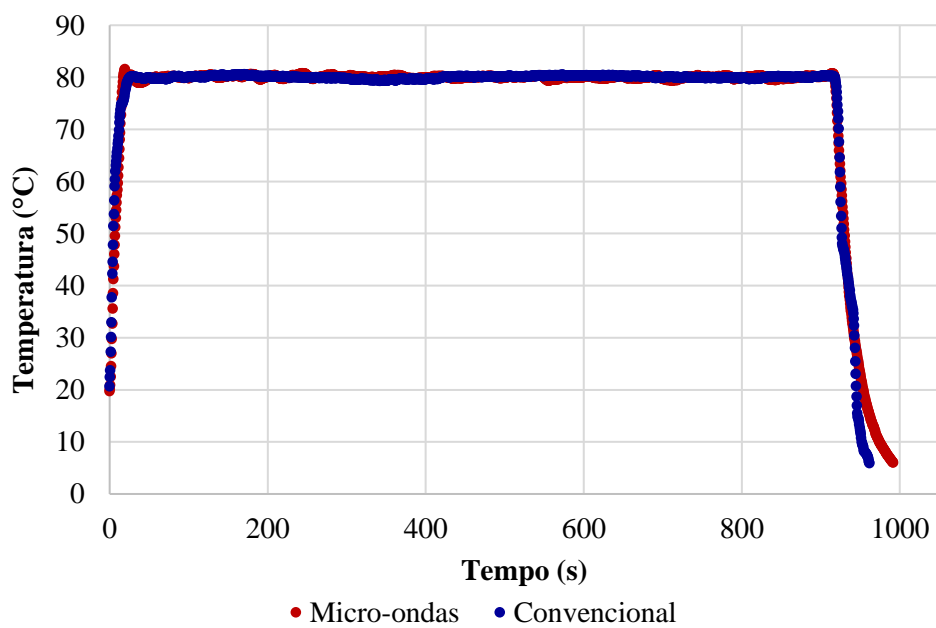


Figura 10 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 15 minutos.

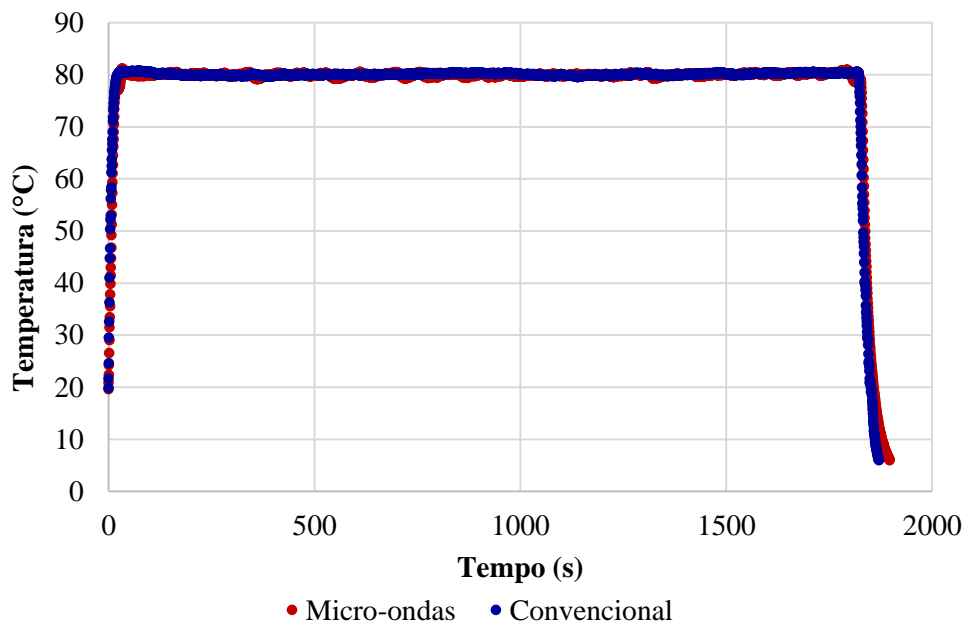


Figura 11 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 80 °C por 30 minutos.

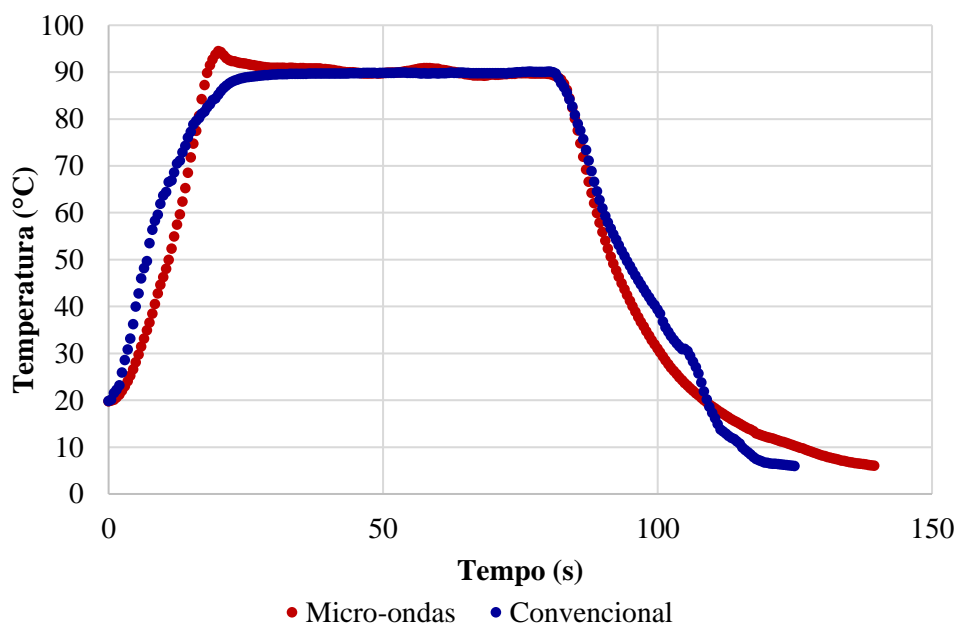


Figura 12 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 1 minuto.

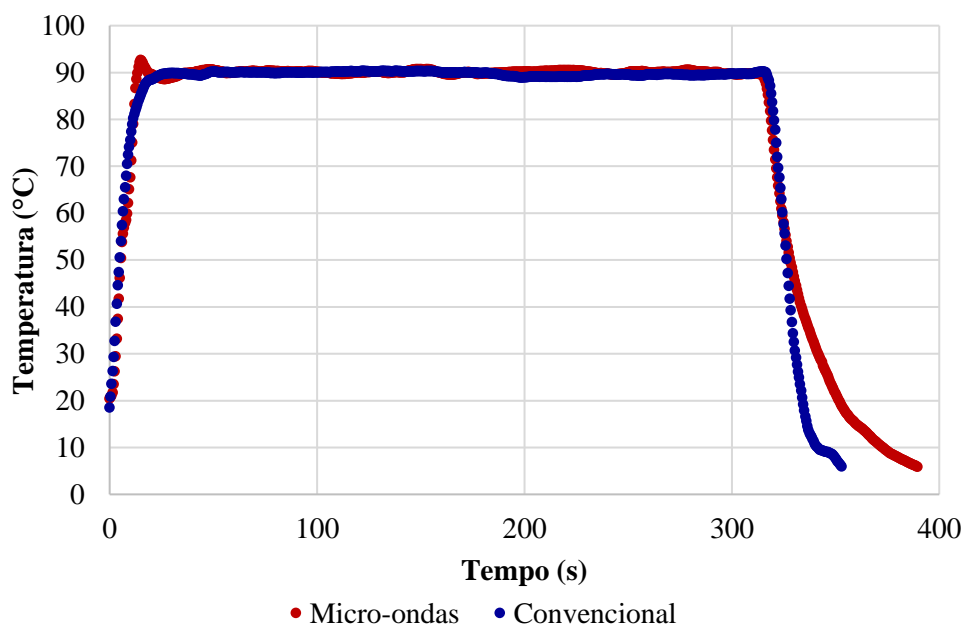


Figura 13 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 5 minutos.

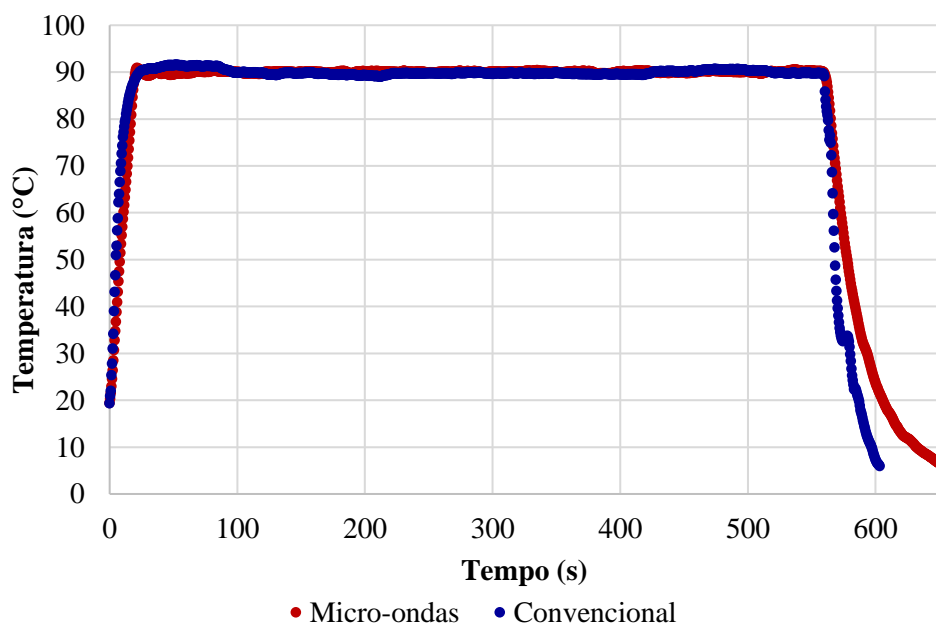


Figura 14 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 9 minutos.

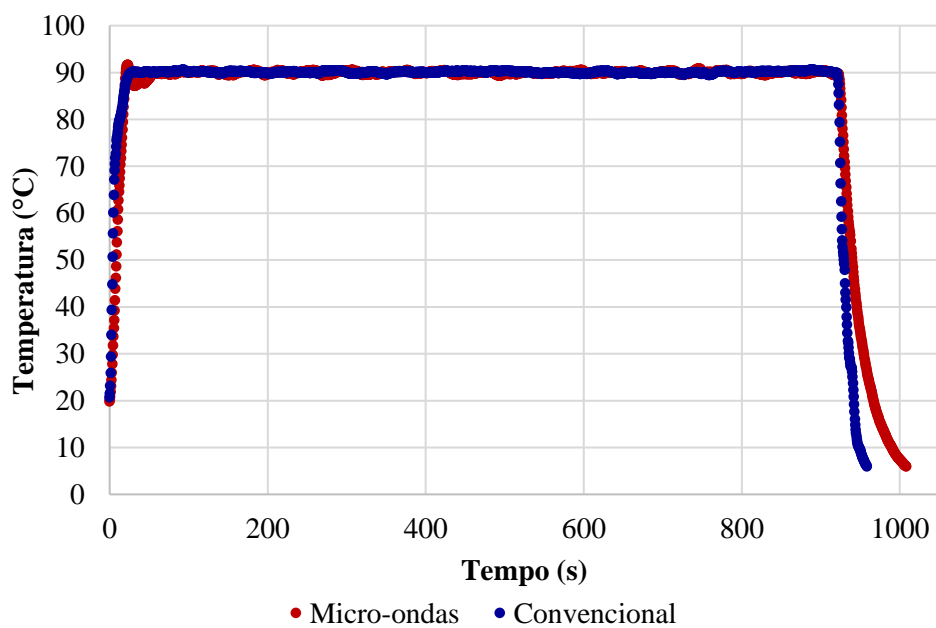


Figura 15 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 15 minutos.

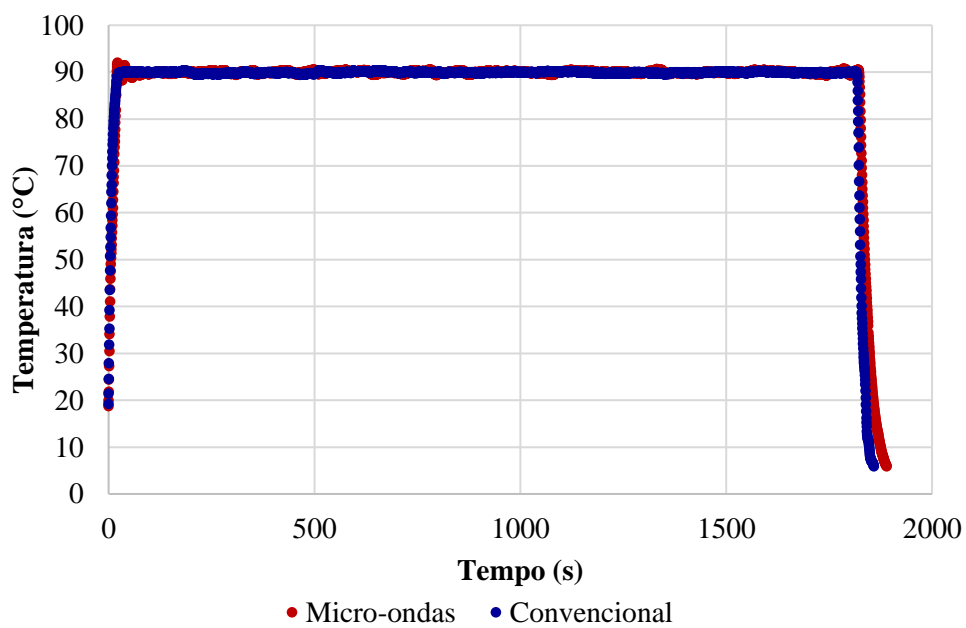


Figura 16 - Histórico de temperatura do extrato hidrossolúvel de soja no tratamento térmico por micro-ondas e convencional a 90 °C por 30 minutos.

4.3 DEFINIÇÃO DO MÉTODO EXPERIMENTAL PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

4.3.1 Método 1

No primeiro teste, experimentou-se utilizar o método em microplaca descrito por Van der Ven et al. (2005). Para a extração dos inibidores de tripsina do EHS, amostras foram diluídas (1:5, v/v) em solução de hidróxido de sódio 0,015 M e cloreto de sódio 0,5 M e mantidas sob agitação por 2 h a temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 11.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes correspondem aos extratos de inibidores de tripsina (extrato IT).

Foi preparada uma solução de enzima (0,08 mg/mL) diluindo tripsina bovina em solução tampão Tris-cloreto de cálcio (0,02 M tris-hidroximetilaminometano, pH 8,2). Como substrato da tripsina utilizou-se uma solução de BAPNA (4 mg/mL), diluída também na solução tampão. Nessa etapa observou-se dificuldade na diluição.

Na microplaca, 50 μ L de extrato IT e 50 μ L de solução de tripsina foram pipetadas e misturadas por 10 min. Uma alíquota de 50 μ L de BAPNA foi então adicionada. A variação da absorbância foi medida em comprimento de onda de 405 nm por 10 min. No entanto, nessa etapa não foram obtidos resultados esperados, visto que os valores de absorbância estavam abaixo de 0,1 e não apresentaram variação significativa com o tempo. Foram testados também outras combinações de volumes de extrato, tripsina e BAPNA, porém os valores de absorbância permaneceram baixos e praticamente constantes com o tempo. Tais resultados não foram coerentes com os obtidos durante um ensaio preliminar utilizando o método em cubeta.

Dessa forma, entre as possíveis causas levantou-se a pouca dissolução do BAPNA devido a não adição de dimelsulfóxido (este utilizado em outros métodos durante a dissolução do BAPNA); a diluição da tripsina em solução tampão (em vez de utilizar solução de HCl como descrito em outros métodos); procedimento de extração de inibidores de tripsina não adequada.

4.3.2 Método 2

Baseando-se no método de Liu, K. (2019), foi preparada uma solução de enzima 0,002% (m/v) diluindo 0,2 mg de tripsina em 10 ml de solução de ácido clorídrico 1 mM. O substrato da tripsina 0,04% (m/v) foi preparado diluindo 10 mg de BAPNA com 250 µl de dimetilsulfóxido, seguido de adição de solução tampão Tris-cloreto de cálcio (0,02 M, pH 8,2) pré-aquecido a 37 °C até completar volume de 25 ml. Para a extração dos inibidores de tripsina do EHS, foram pesados 1,0 g de cada amostra, as quais foram diluídas em 50 ml de solução de hidróxido de sódio 0,01 M e mantidas sob agitação por 3 h a temperatura ambiente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a 11.000 rpm por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes correspondem aos extratos de inibidores de tripsina (extrato IT).

Adicionou-se 0,5 ml de amostra de extrato IT, 0,5 ml de água destilada e 2,5 ml da solução de BAPNA em tubo tipo Falcon, seguido de agitação. Adicionou-se então 1,0 ml de solução de tripsina e colocou-se o tubo em banho termostático modelo ECO RE 620 (Lauda, Brasil) a 37 °C por 10 minutos. A seguir, foi adicionado 0,5 ml de solução de ácido acético 30% (v/v) ao tubo a fim de suspender a reação. Foi realizada a leitura da amostra em espectrofotômetro modelo UV-Vis 700 Plus (Femto, Brasil) no comprimento de onda de 410 nm.

Além da leitura da amostra (S), em duplicata, foi também feita a leitura de referência (R), em duplicata, cuja solução foi feita simultaneamente com a da amostra, porém substituindo o extrato IT pelo mesmo volume de água destilada. Ademais, foi feito também o branco de amostra (SB) e o branco de referência (RB), os quais foram preparados com os mesmos volumes de reagentes de, respectivamente, S e R, contudo invertendo-se a ordem de adição de solução de tripsina e de ácido acético. Para as soluções de S e SB, a proporção de água : extrato IT adicionados foram variados de modo a obter uma % de inibição entre 30 e 70%, devido ao desvio de linearidade da atividade da tripsina em relação ao níveis de inibidores fora dessa faixa de inibição (LIU, MARKAKIS, 1989; LIU, 2019).

Entretanto, para esse método observou que não havia consistência dos resultados, o que dificulta a comparação entre amostras submetidas a diferentes condições de tratamento térmico. Na Figura 17 tem-se os resultados de um dos experimentos seguindo o Método 2. Pode-se observar que nas amostras tratadas a 80 °C, por exemplo, o valor de atividade residual não é estritamente decrescente com o tempo de retenção, fato que seria

esperado. Ademais, comparando as amostras que foram submetidas ao mesmo tempo de tratamento, esperava-se que aquelas tratadas sob maiores temperaturas apresentariam menor valor de atividade residual, porém tal comportamento não se apresentou consistente nos resultados obtidos por este método.

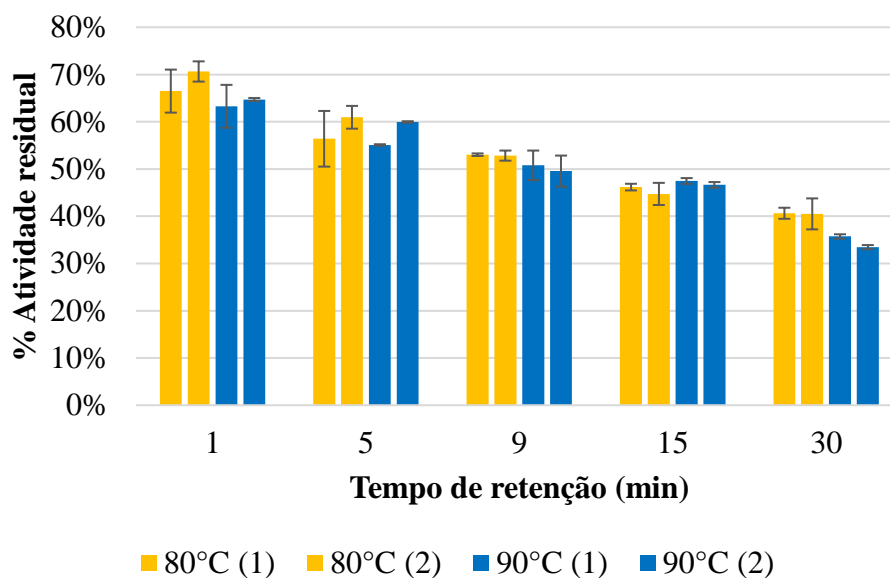


Figura 17 - Comparação de resultados, a partir do Método 2, de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento por micro-ondas em diferentes condições de tempo e temperatura.

Tal problema pode ser atribuído, sobretudo, à dificuldade de manuseio das amostras ao adicionar as soluções de tripsina e/ou de ácido acético. Visto que cada experimento de determinação de inibidores de tripsina utilizava cerca de 40 tubos (Figura 18) e, portanto, ocorria uma diferença da ordem de 2 minutos entre a adição de reagente no primeiro e último tubo, as reações não ocorriam exatamente sob as mesmas condições entre as amostras, dificultando a comparação entre os resultados.

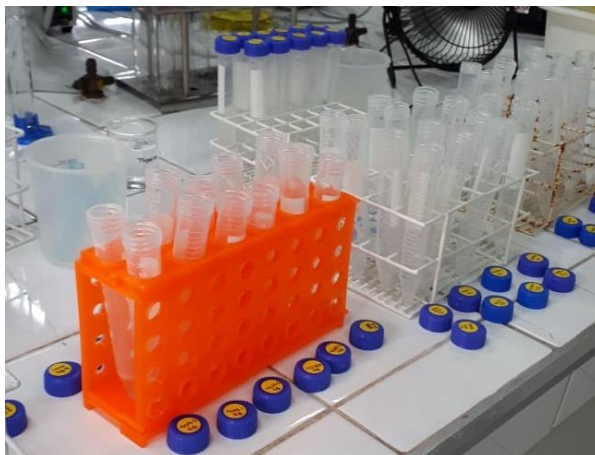


Figura 18 - Tubos utilizados no Método 2.

4.3.3 Método 3

A fim de uniformizar as condições de reação entre as amostras e, simultaneamente, levar em consideração a quantidade limitada de reagente disponível para a execução dos experimentos, buscou-se e adaptou-se um método cuja leitura fosse feita em microplaca. Trata-se do método descrito na seção 2.4.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

Os resultados de atividade residual dos inibidores de tripsina submetidos ao tratamento térmico, tanto por micro-ondas quanto o convencional, estão representados nas Figura 19 a Figura 21.

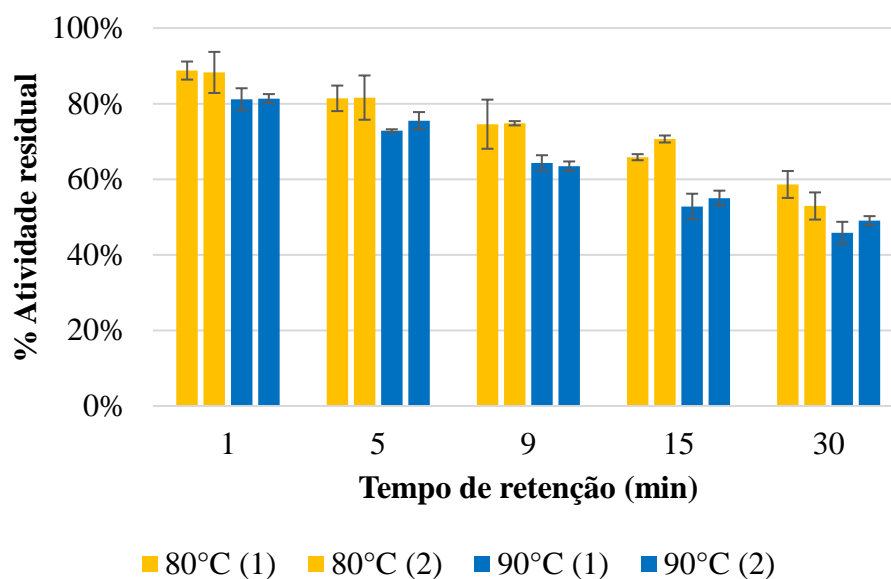


Figura 19 - Comparação de resultados, a partir do Método 3, de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento por micro-ondas em diferentes condições de tempo e temperatura

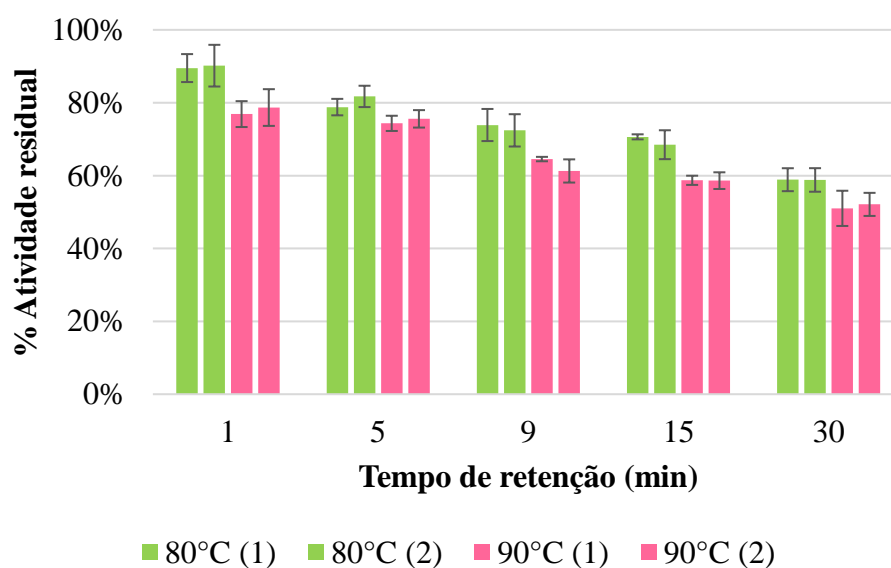


Figura 20 - Comparação de resultados, a partir do Método 3, de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento convencional em diferentes condições de tempo e temperatura

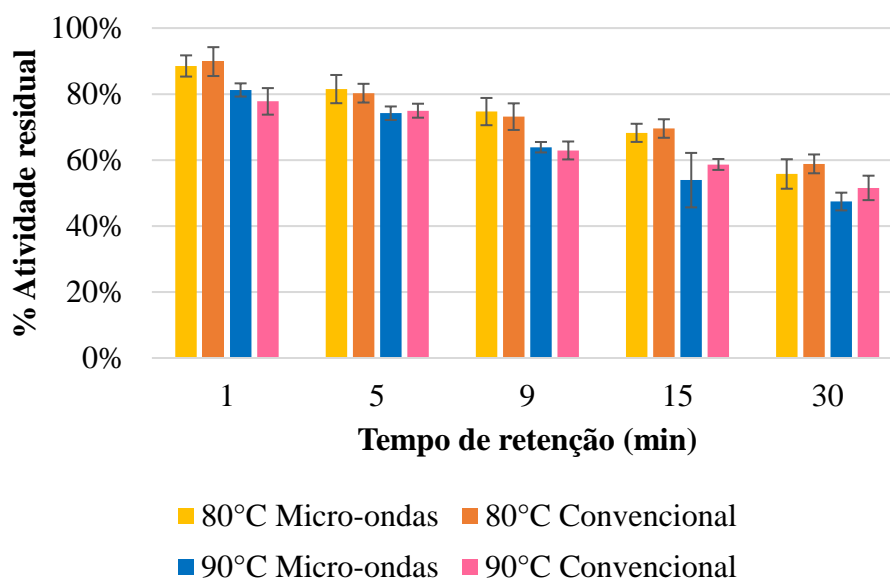


Figura 21 - Comparação de resultados, a partir do Método 3, da média de atividade residual dos inibidores de tripsina de amostras de extrato hidrossolúvel de soja submetidas ao tratamento por micro-ondas e convencional em diferentes condições de tempo e temperatura

Pode-se observar que os valores obtidos foram decrescentes com o aumento do tempo de retenção e temperatura. Além disso, as amostras que foram processadas em mesmas condições de tempo-temperatura, independentemente do tipo de tratamento térmico ao qual foram submetidas, resultaram em valores de atividade residual próximos. Tais resultados são coerentes com o esperado.

Ademais, observa-se que com o tratamento de 30 minutos a 90 °C foi possível inativar apenas cerca 50% da atividade dos inibidores de tripsina do EHS.

De fato, estudos têm mostrado a dificuldade de inativar completamente os inibidores de tripsina sem prejudicar os nutrientes do extrato de soja. Os inibidores de tripsina podem ser divididos em dois tipos principais: Kunitz (KSTI) e Bowman-Birk (BBI). O KSTI é uma proteína com peso molecular de cerca de 20.000 e possui dois ligações dissulfeto. Já o BBI é uma proteína de peso molecular de 8.000 e contém sete ligações dissulfeto, o que o torna mais estável ao calor, visto que a maior proporção de ligações dissulfeto estabilizam a molécula de modo a permitir sua atividade biológica (KWOK; NIRANJAN, 1995).

Segundo Kwok et al. (1993), o tempo de retenção necessário para inativar 90% dos inibidores de tripsina em tratamento convencional a 93 °C foi de 60 e 25 minutos

para, respectivamente, extrato de soja com pH 6.5 e 7.5. Resultado coerente com o obtido por Van Buren et al. (1964), o qual obteve que em um tratamento a 93 °C, visando inativação de 90% dos inibidores de tripsina, foi necessário tratamento térmico de 30 a 75 minutos para diferentes lotes de leite de soja. Já para um tratamento a 121 °C, relatou tempo de retenção de 5 a 10 minutos para a mesma porcentagem de inativação.

Em outro estudo de Kwok e Niranjani (1995), observou-se a dificuldade de se inativar a atividade inibidores de tripsina para 10% em temperatura abaixo de 100 °C, mostrando a estabilidade dessa proteína. Foram feitos também tratamentos térmicos de 280 segundos a 121 °C, 165 segundos a 132 °C, 100 segundos a 143 °C e 40 segundos a 154 °C, resultando em redução para 7 a 8% da atividade original dos inibidores de tripsina.

4.5 CINÉTICA DE INATIVAÇÃO DOS INIBIDORES DE TRIPSINA

4.5.1 Tratamento por micro-ondas

Os resultados dos parâmetros cinéticos de inativação dos inibidores de tripsina ajustados pelo modelo de primeira ordem estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento micro-ondas.

Parâmetros		Critérios de ajuste	
$D_{90^{\circ}C}$ (s)	4202	SEQ	0,148
z (°C)	88,50	R^2	0,65

Além disso, nas Figuras 22 e 23 têm-se os gráficos relacionando a atividade residual predita pelo modelo de primeira ordem e a experimental.

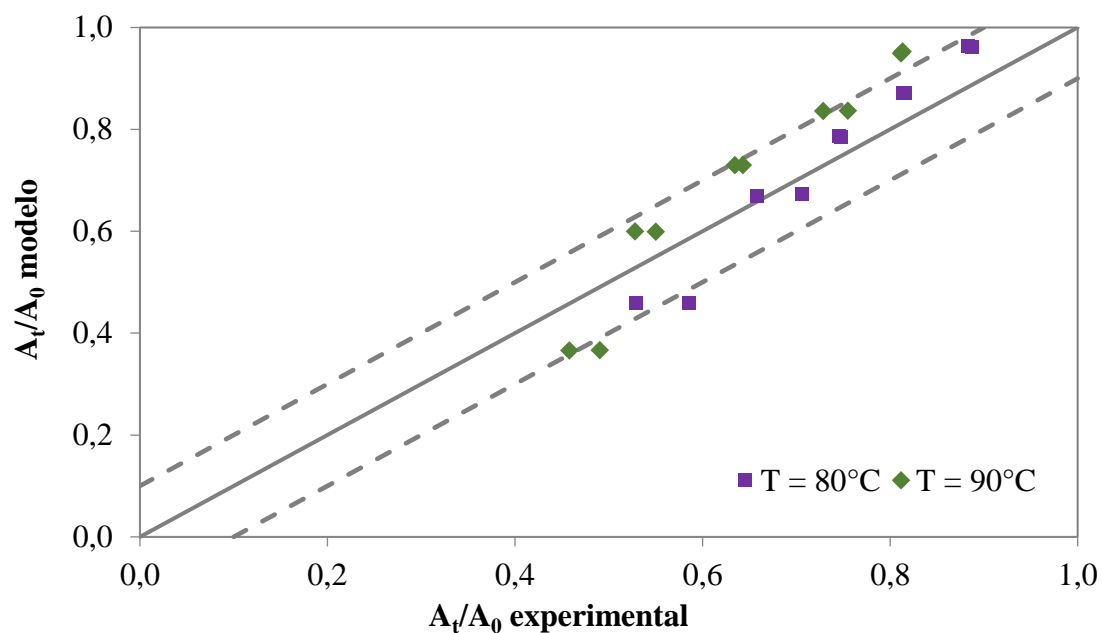


Figura 22 - Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem) e com a experimental por tratamento micro-ondas

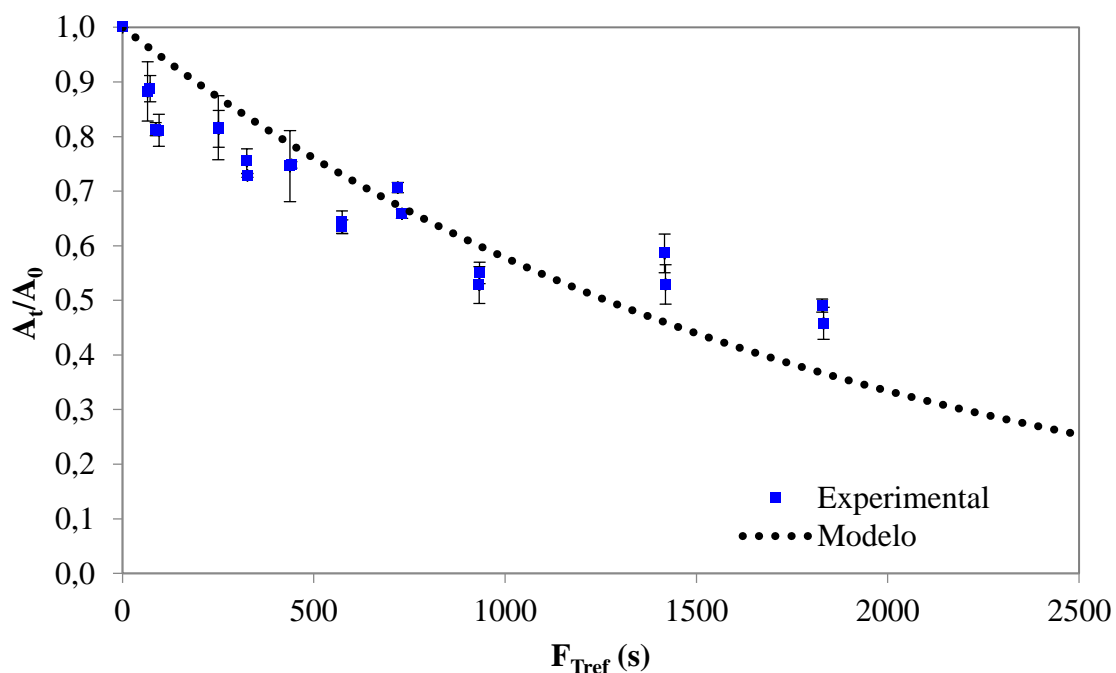


Figura 23 - Gráfico da atividade residual predita (modelo de primeira ordem) e experimental dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção equivalente a um tratamento térmico micro-ondas a 90 °C.

O comportamento de inativação dos inibidores de tripsina não foi bem ajustado com o modelo de primeira ordem, apresentando R^2 de 0,65. Além disso, observa-se que o gráfico de paridade apresenta uma parcela considerável de pontos com desvio igual ou

superior a 10% em relação à reta de 45°, indicando o não bom ajuste do modelo cinético. Contudo, o parâmetro $D_{90^{\circ}\text{C}}$ (s) obtido é coerente com o calculado por Kwok e Keshavan (1995) utilizando os dados experimentais de Hackler et al. (1965), que resultou em um $D_{93^{\circ}\text{C}}$ igual a 4200 segundos.

Aplicando o modelo de primeira ordem com duas frações, obteve-se os parâmetros cinéticos de inativação dos inibidores de tripsina ajustados apresentados na Tabela 2 e o correspondente modelo obtido (Figura 24).

Tabela 2 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem com duas frações da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento micro-ondas.

Parâmetros		Critérios de ajuste	
$D_{90^{\circ}\text{C},R}$ (s)	6082	SEQ	0,021
z_R (°C)	38,77	R^2	0,95
$D_{90^{\circ}\text{C},S}$ (s)	69,53		
z_S (°C)	21,58		
α	0,82		

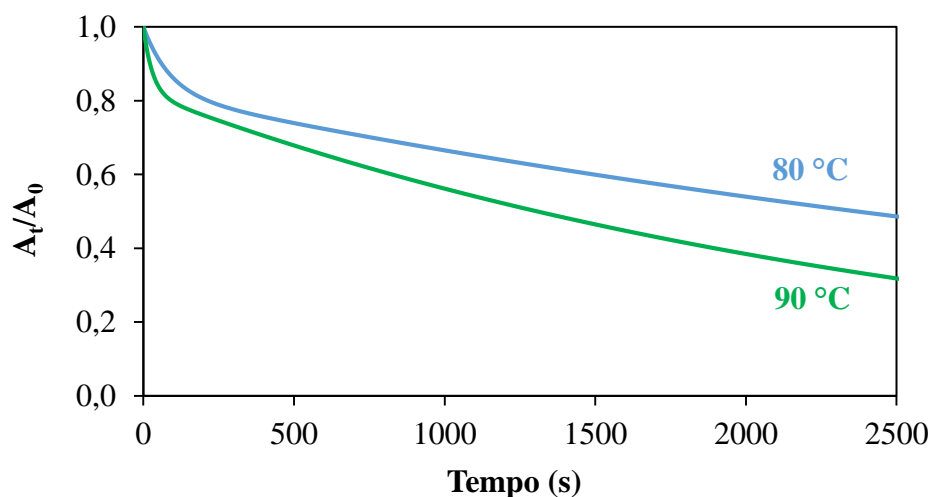


Figura 24 - Gráfico da atividade residual dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção no tratamento térmico micro-ondas a 80 e 90 °C, predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações

Na Figura 25 tem-se o gráfico de paridade relacionando a atividade residual predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações e a experimental.

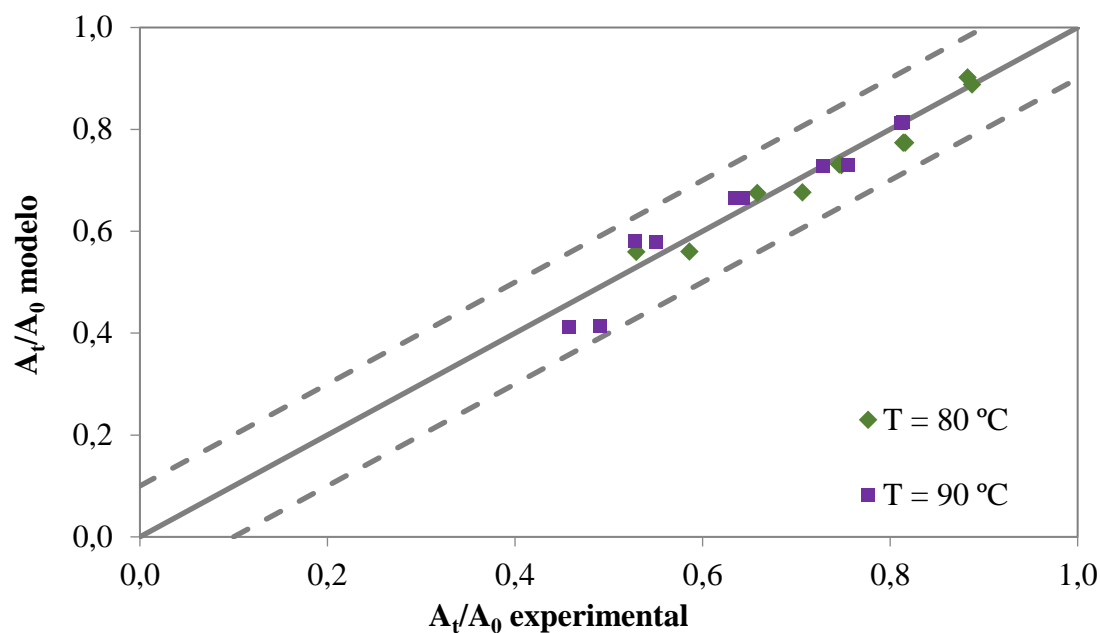


Figura 25 – Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem com duas frações) e com a experimental por tratamento micro-ondas.

Pode-se observar que o comportamento de inativação dos inibidores de tripsina foi melhor ajustado pelo modelo de primeira ordem com duas frações, o qual apresentou menores valores de SEQ e um R^2 mais próximo de 1 em comparação ao primeiro modelo. Ademais, nota-se que o gráfico de paridade apresenta espalhamento de pontos distribuídos aleatoriamente e próximos à reta de 45°, com baixo desvio (menos de 0,1), indicando bom ajuste do modelo cinético.

De fato, como apresentado na seção 4.4, os inibidores de tripsina podem ser classificados em dois tipos principais: KSTI e BBI, sendo o primeiro a fração sensível e o último a fração resistente, comportamento que é considerado por esse modelo.

Dessa forma, com o modelo cinético de primeira ordem com duas frações determinado, foi feita a validação dos resultados com os valores obtidos experimentalmente de amostras de EHS tratadas por aquecimento micro-ondas em outras combinações de temperatura e tempo de retenção (Figura 26).

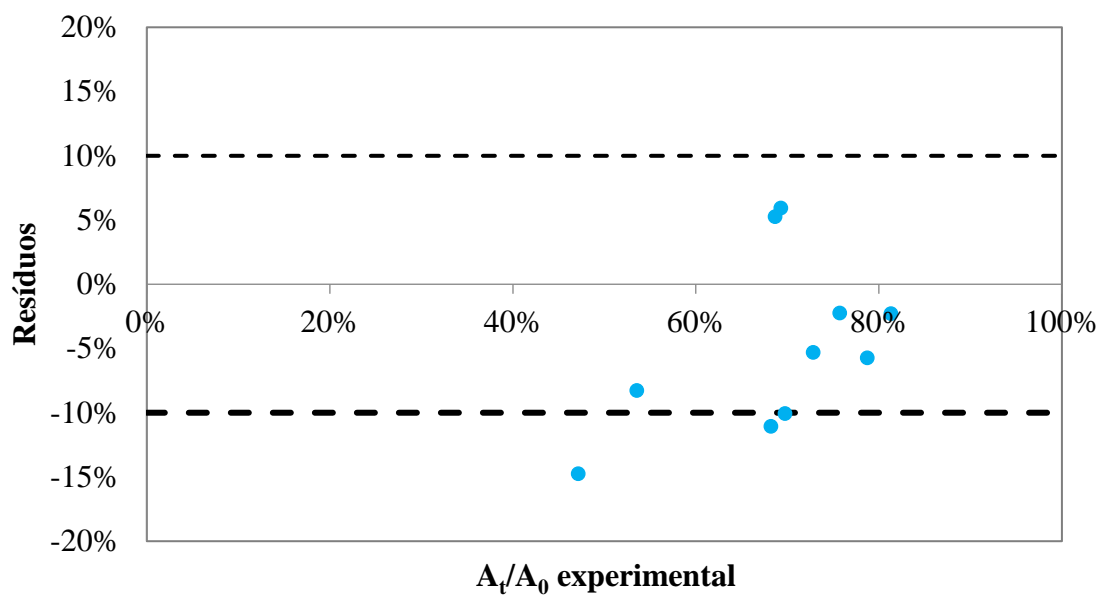


Figura 26 - Resultados de validação do modelo cinético de primeira ordem com duas frações para o tratamento por micro-ondas

Pode-se observar que foram obtidos resíduos com disparidade menores que 10%, com exceção dos correspondentes aos tratamentos à 95 °C. No entanto, considerando a sensibilidade da análise de determinação de inibidores de tripsina, tal variação pode ser considerada razoável.

4.5.2 Tratamento convencional

Os resultados dos parâmetros cinéticos de inativação dos inibidores de tripsina ajustados pelo modelo de primeira ordem, assim como os critérios de ajuste, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento convencional.

Parâmetros		Critérios de ajuste	
$D_{90^{\circ}C}$ (s)	4515	SEQ	0,205
z (°C)	87,90	R^2	0,40

Nas Figuras 27 e 28 têm-se os gráficos relacionando a atividade residual predita pelo modelo de primeira ordem e a experimental.

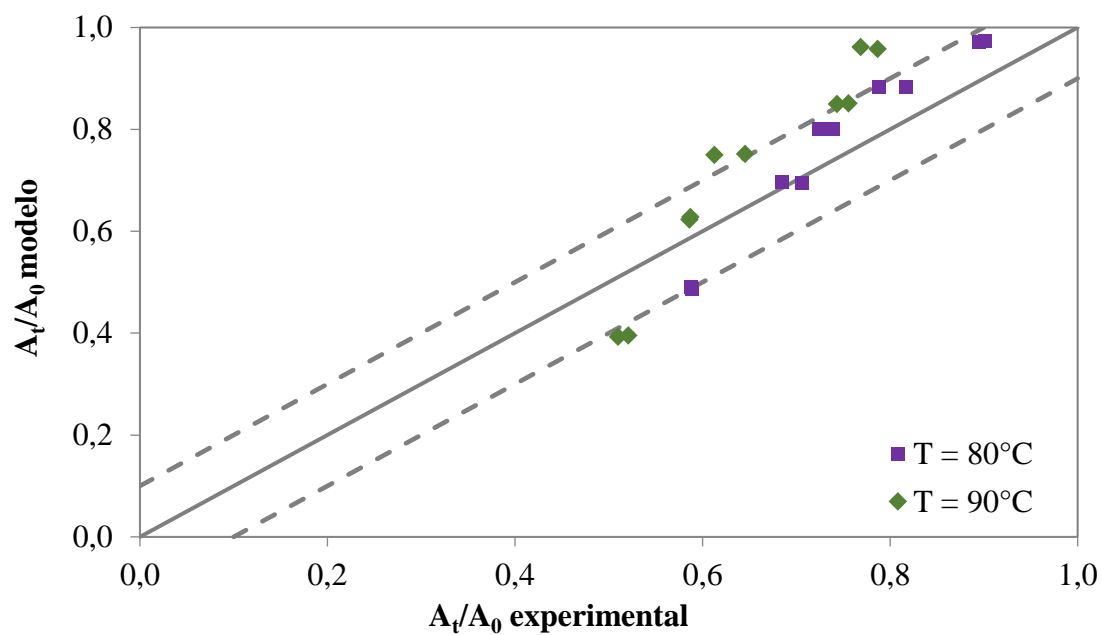


Figura 27 - Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem) e com a experimental por tratamento convencional

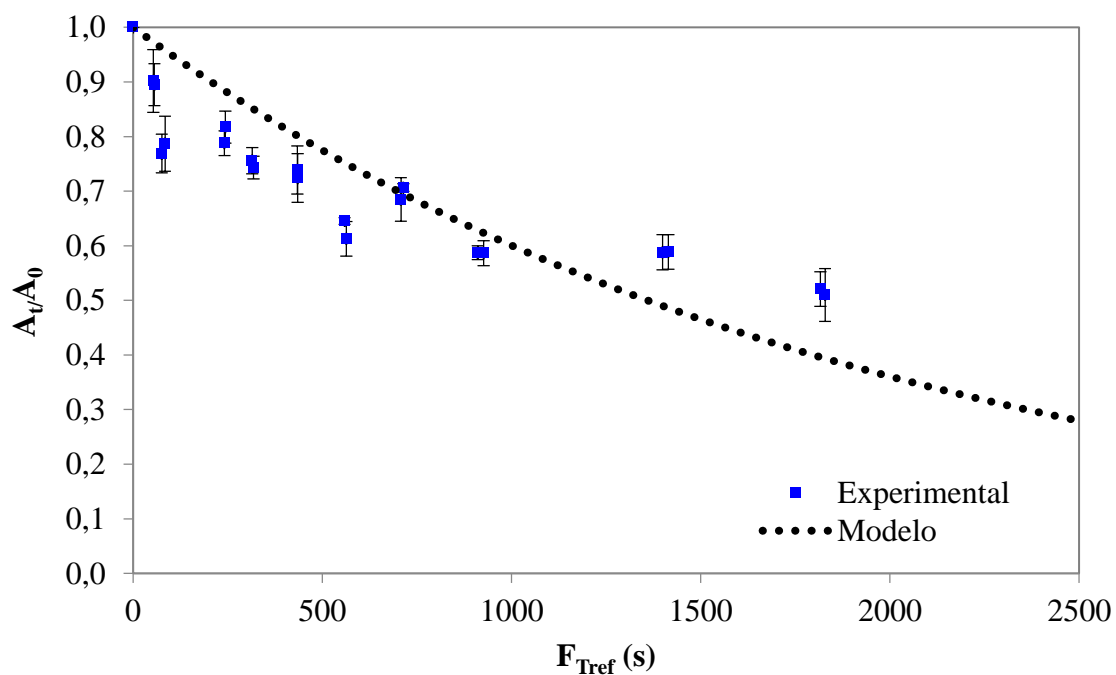


Figura 28 - Gráfico da atividade residual predita (modelo de primeira ordem) e experimental dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção equivalente a um tratamento térmico convencional a 90°C

O comportamento de inativação dos inibidores de tripsina não foi bem ajustado com o modelo de primeira ordem, apresentando R^2 de 0,40. Ademais, pode-se observar

que o gráfico de paridade apresenta cerca de 50% dos pontos com desvio igual ou superior a 10% em relação à reta de 45°, sobretudo os correspondentes ao tratamento à 90 °C, indicando o não bom ajuste do modelo cinético. No entanto, o parâmetro $D_{90^{\circ}C}$ (s) obtido também é coerente com o calculado por Kwok e Keshavan (1995) utilizando os dados experimentais de Hackler et al. (1965).

Aplicando o modelo de primeira ordem com duas frações, obteve-se os parâmetros cinéticos de inativação dos inibidores de tripsina ajustados apresentados na Tabela 4 e o correspondente modelo obtido (Figura 29).

Tabela 4 - Parâmetros ajustados e critérios de ajuste do modelo de primeira ordem com duas frações da cinética de inativação de inibidores de tripsina por tratamento convencional.

Parâmetros		Critérios de ajuste	
$D_{90^{\circ}C,R}$ (s)	8766	SEQ	0,015
z_R (°C)	38,98	R^2	0,96
$D_{90^{\circ}C,S}$ (s)	40,00		
z_S (°C)	10,61		
α	0,78		

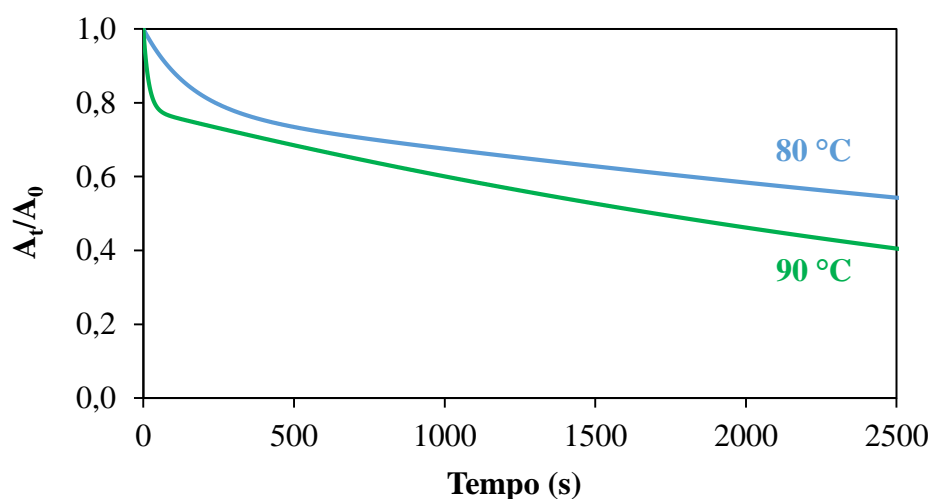


Figura 29 - Gráfico da atividade residual dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção no tratamento térmico convencional a 80 e 90 °C, predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações.

Na Figura 30 tem-se o gráfico de paridade relacionando a atividade residual predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações e a experimental.

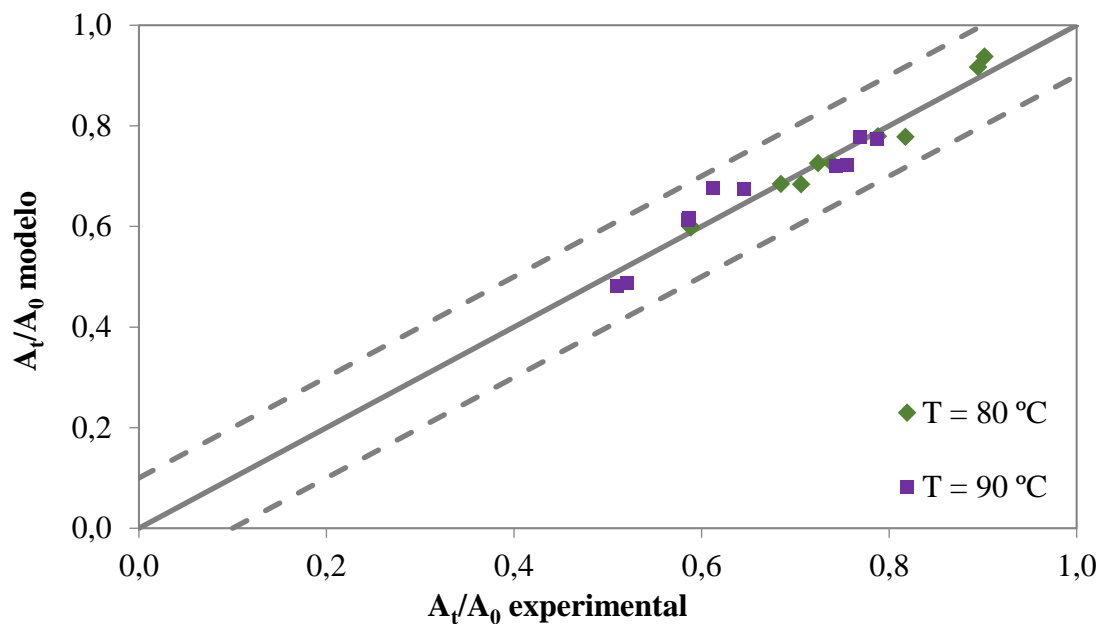


Figura 30 - Gráfico de paridade relacionando a atividade residual dos inibidores de tripsina predita (modelo de primeira ordem com duas frações) e com a experimental por tratamento convencional.

Assim como no micro-ondas, o tratamento convencional foi também melhor ajustado pelo modelo de primeira ordem com duas frações, com menores valores de SEQ e um R^2 mais próximo de 1 em comparação ao modelo de primeira ordem comum. Além disso, o gráfico de paridade apresenta espalhamento de pontos distribuídos aleatoriamente e próximos à reta de 45°, com baixo desvio (menos de 0,1), indicando bom ajuste do modelo cinético.

Com este modelo ajustado, foi feita a validação dos resultados com os valores obtidos experimentalmente de amostras de EHS tratadas por aquecimento convencional em outras combinações de temperatura e tempo de retenção (Figura 31).

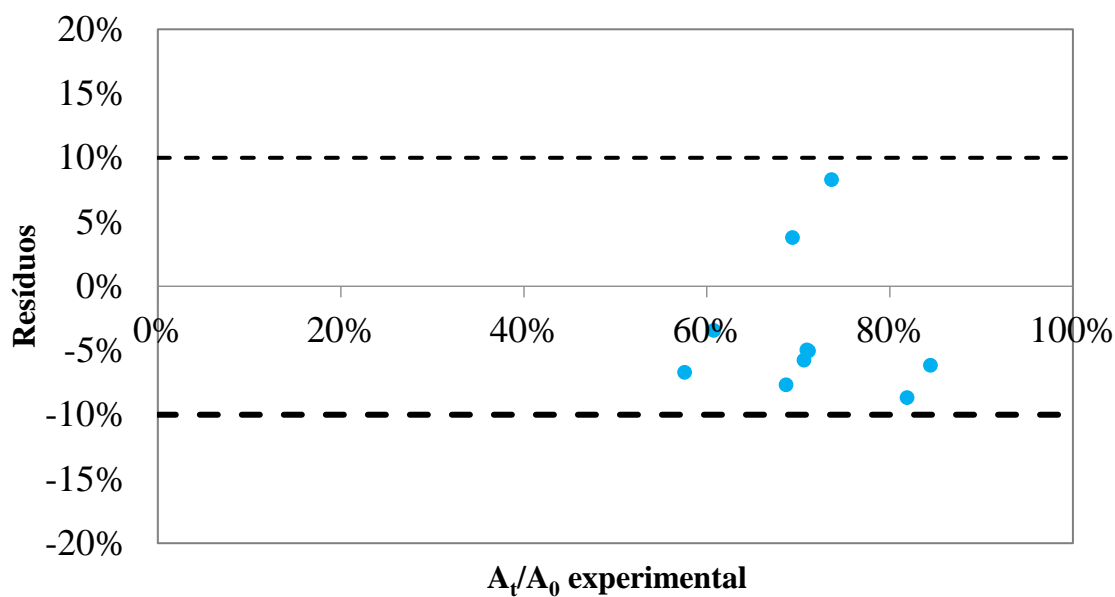


Figura 31 - Resultados de validação do modelo cinético de primeira ordem com duas frações para o tratamento convencional.

Pode-se observar que foram obtidos resíduos com disparidade menores que 10%, e, portanto, o modelo ajustou bem os pontos de validação.

A adoção do modelo de primeira ordem com duas frações vai de acordo com o descrito Johnson et al. (1980), para EHS aquecido por infusão de vapor; Rouhana et al. (1996), para EHS tratado por flash pasteurização; van den Hout et al. (1998), para farinha de soja submetida ao aquecimento convencional.

4.5.3 Comparação entre os tratamentos térmicos

Comparando-se os gráficos dos modelos cinéticos de primeira ordem com duas frações para a inativação dos inibidores de tripsina do EHS sob ambos os tratamentos térmicos, pode-se observar que o por micro-ondas apresentou um melhor desempenho na inativação (Figura 32). Tal comportamento foi também observado por Vagadia et al. (2018). No entanto, a diferença dos resultados de inativação entre os tratamentos é pequena (<9%), podendo ser devido a erros experimentais e/ou erros de predição. Outra hipótese que também é levantada em outros estudos é a possível existência de efeitos não térmicos associados às micro-ondas, como em Kermasha et al. (1993) na inativação de enzima lipoxigenase da soja, e Tajchakavit e Ramaswamy (1995) na inativação de enzima pectinametilesterase do suco de laranja.

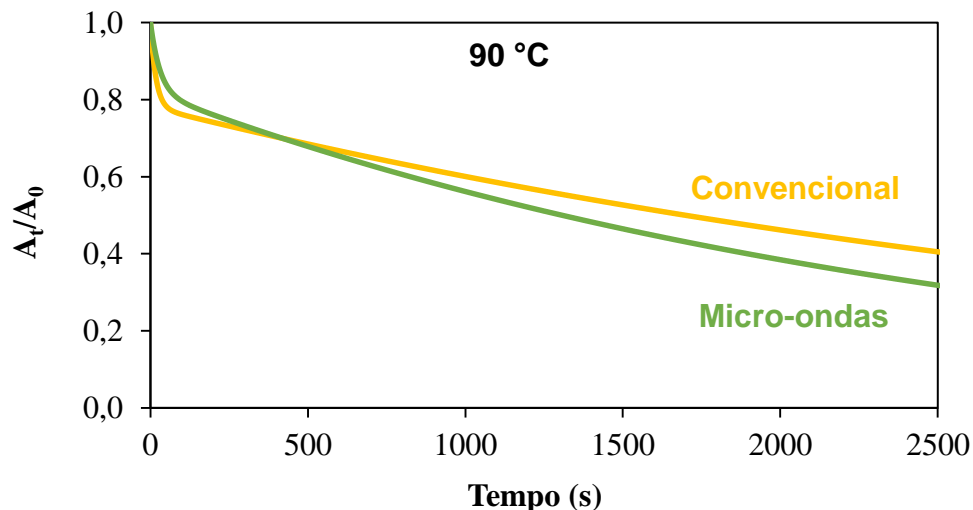


Figura 32 - Gráfico da atividade residual dos inibidores de tripsina em função do tempo de retenção no tratamento térmico convencional e por micro-ondas a 90 °C, predita pelo modelo de primeira ordem com duas frações.

5. CONCLUSÕES

Durante o Trabalho de Conclusão de Curso foi feita a pesquisa bibliográfica, estudando-se o mecanismo de aquecimento por micro-ondas e comparações dessa tecnologia com o tratamento térmico convencional, especialmente em derivados de soja. Trata-se de uma tecnologia emergente caracterizada pelo processamento mais rápido e potencialmente menos prejudicial à qualidade nutricional e sensorial do produto.

Foram também realizados ensaios no reator micro-ondas e no banho termostático. Os perfis de temperatura obtidos foram conforme desejados, com patamares de temperatura quase constantes ao longo do tempo de retenção.

A maior parte do tempo do projeto foi dedicada à definição do método para determinação da atividade dos inibidores de tripsina do EHS, baseada na hidrólise do substrato BAPNA. Consolidado o método na microplaca, foram obtidos resultados coerentes de atividade residual dos inibidores de tripsina, cuja inativação é maior com o aumento da temperatura e/ou tempo de tratamento térmico. Observou-se que mesmo quando submetido a 90 °C durante 30 minutos, o tratamento foi suficiente para apenas inativar cerca de 50% dos inibidores. Tal fato pode ser explicado pela estabilidade térmica

de uma porção desses inibidores, sendo necessária uma operação em temperaturas e/ou tempo de retenção superiores para maior inativação desses componentes antinutricionais.

BIBLIOGRAFIA

AGUIAR, H. DE F.; YAMASHITA, A. S.; GUT, J. A. W. Development of enzymic time-temperature integrators with rapid detection for evaluation of continuous HTST pasteurization processes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, p. 110–116, 2012.

ANDERSON, R.L.; WOLF, W.J. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 581-588, 1995.

ANG, H. G.; KWIK, W. L.; THENG, C. Y. Development of soymilk—A review. **Food Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 235–250, 1985.

BELTRÁN, J. A. G.; GIRÓN, Y. E.; SWANSON, B. G.; CÁNOVAS, G. V. B. Pressure and temperature combination for inactivation of soymilk trypsin inhibitors. **Food Chemistry**, v. 116, p. 676-679, 2009.

CHANTAPAKUL, T.; TAO, W.; CHEN, W.; LIAO, X.; DING, T.; LIU, D. Manothermosonication: inactivation and effects on soymilk enzymes. **Ultrasonics – Sonochemistry**, v. 64, n.1, p. 1-9, 2020.

EMBABY, H. E.-S. Effect of heat treatments on certain antinutrients and in vitro protein digestibility of peanut and sesame seeds. **Food Science and Technology Research**, v. 17, p. 31–38, 2010.

FDA. **U.S. Food and Drug Administration**. Food labeling: Health claims; soy protein and coronary heart disease, 1999.

FUJIKAWA, H.; ITOH, T. Characteristics of a multicomponent first-order model for thermal inactivation of microorganisms and enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1–3, p. 263–271, 1996.

GUT, J. A. W.; TADINI, C. C. Processamento Térmico de Alimentos. In: TADINI, C. C. et al. (Eds.). **Operações Unitárias na Indústria de Alimentos**. [s.l.] LTC, p. 443–484, 2016.

HACKLER, L. R.; BUREN, J. P.; STEINKRAUS, K. H.; RAWI, I.; HAND, D. B. Effect of Heat Treatment on Nutritive Value of Soymilk Protein Fed to Weanling Rats. **Journal of Food Science**, v. 30, n.4, p. 723–728, 1965.

HWANG, Y. W.; KIM, S. Y.; JEE, S. H.; KIM, Y. N.; NAM, C. M. Soy food consumption and risk of prostate cancer: A meta-analysis of observational studies. **Nutrition and Cancer**, v. 61, p. 598–606, 2009.

JOHNSON, L. A.; HOOVER, W. J.; DEVOE, C. W.; ERICKSON, L. E.; et al. Modeling the Kinetics of Heat Inactivation of Trypsin Inhibitors during Steam-Infusion Cooking of Soymilk. **Transactions of the ASAE**, v. 23, n. 5, p. 1326-1329, 1980.

KAKADE, M. L.; RACKIS, J. J.; MCGHEE, J. E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A Collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 376–382, 1974.

KERMASHA, S.; BISAKOWSKI, B.; RAMASWAMY, H.; VAN DE VOORT, F. R. Thermal and Microwave Inactivation of Soybean Lipoxygenase. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 3, p. 215–219, 1993.

KERWIN, S. Soy saponins and the anticancer effects of soybeans and soy-based foods. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 4, p. 263–272, 2004.

KOHLI, D.; KUMAR, S.; UPADHYHAY, S.; MISHRA, R. Preservation and processing of soymilk: a review. **International Journal of Food Science and Nutrition**, v.2, n. 6; p. 66-70, 2017.

KUBO, M. T. K.; ROJAS, M. L.; CURET, S.; BOILLEREAUX, L.; AUGUSTO, P. E. D. Peroxidase inactivation kinetics is affected by the addition of calcium chloride in fruit beverages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 610–616, 2018

KWOK, K. C.; QIN, W. H.; TSANG, J. C. Heat inactivation of trypsin inhibitors in soymilk at ultra-high temperatures. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, p. 859–862, 1993.

KWOK, K. C.; NIRANJAN, K. Review: Effect of thermal processing on soymilk. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 30, n. 3, p. 263–295, 1995.

LAKSHMANAN, R.; DE LAMBALLERIE, M.; JUNG, S. Effect of soybean-to-water ratio and pH on pressurized soymilk properties. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 9, p. 1–8, 2006.

LIENER, I.E. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 31-67, 1994.

LIU, K. Soybean trypsin inhibitor assay: further improvement of the standard method approved and reapproved by American Oil Chemists' Society and American Association of Cereal Chemists International. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, p. 635-645, 2019.

LIU, K.; MARKAKIS, P. An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybean products. **Cereal Chemistry**, v. 66, n. 5, p. 415–422, 1989.

MESSINA, M.; LANE, B. Soy protein, soybean isoflavones and coronary heart disease risk: where do we stand? **Future Lipidology**, v. 2, n. 1, p. 55-74, 2007.

NELSON, A. I.; STEINBERG, M. I.; WEI, L. S. Illinois process for preparation of soymilk. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 1, p. 57-61, 1976.

PELEG, M.; NORMAND, M. D. Calculating microbial survival parameters and predicting survival curves from non-isothermal inactivation data. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 409–418, 2004.

ROUHANA, A.; ADLER-NISSEN, J.; COGAN, U.; FRØKIÆR, H. heat inactivation kinetics of trypsin inhibitors during high temperature-short time processing of soymilk. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 2, p. 265-269, 1996.

SALAZAR-GONZALEZ, C.; SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, M. F.; LÓPES-MALO, A.; SOSA-MORALES, M. E. Recent studies related to microwave processing of fluid foods. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 31–46. 2012.

SETHI, S., TYAGI, S. K., ANURAG, R. K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 9, p. 3408–3423, 2016.

SIGUEMOTO, É. S.; PEREIRA, L. J.; GUT, J. A. W. Inactivation kinetics of pectin methylesterase, polyphenol oxidase, and peroxidase in cloudy apple juice under

microwave and conventional heating to evaluate non-thermal microwave effects. **Food and Bioprocess Technology**, n. 2008, p. 1–11, 2018.

TAJCHAKAVIT, S.; RAMASWAMY, H. S. Continuous-Flow Microwave Heating of Orange Juice: Evidence of Nonthermal Effects. **Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy**, v. 30, n. 3, p. 141–148, 1995.

TANG, J. Dielectric properties of foods. In: SCHUBERT, H.; REGIER, M. **The microwave processing of food**. Boca Ratón: Woodhead Publishing Limited. cap. 2. p 22-40, 2005.

USDA. **United States Department of Agriculture**. World Agricultural Production, 2020. Disponível em <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>

VAGADIA, B. H; VANGA, S. K; SINGH, A.; GARIEPY, Y.; RAGHAVAN, V. Comparison of conventional and microwave treatment of soymilk for inactivation of trypsin inhibitors and in vitro protein digestibility. **Foods**, v. 7, n. 6, p. 1-14, 2018.

VAGADIA, B. H; VANGA, S. K; RAGHAVAN, V. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, n. February, p. 115-125, 2017.

VAN BUREN, J. P.; STEINKRAUS, K. H.; HACKLER, L. R.; EL RAWI, I.; HAND, D. B. Heat effects on soymilk, indices of protein quality in dried soymilks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 12, n. 6, p. 524–528, 1964.

VAN DEN HOUT, R.; POUW, M.; GRUPPEN, H.; VAN'T RIET, K. Inactivation kinetics study of the Kunitz soybean trypsin inhibitor and the Bowman-Birk inhibitor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 281-285, 1998.

VAN DER VEN, C.; MATSER, A. M.; VAN DEN BERG, R. W. Inactivation of soybean trypsin inhibitors and lipoxygenase by highpressure processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1087–1092, 2005.

WANG, Y.; WIG, T.; TANG, J.; HALLBERG, L. Dielectric properties of foods relevant to RF and microwave pasteurization and sterilization. **Journal of Food Engineering**. v. 57. P. 257–268, 2003.

ZHU, X.; GUO, W.; WU, X. Frequency- and temperature-dependent dielectric properties of fruit juices associated with pasteurization by dielectric heating. **Journal of Food Engineering**, v. 109. p. 258-266, 2012.